

**Neuroprotektion axotomierter retinaler Ganglienzellen  
durch Statine: Einfluss auf das proapoptotische  
Protein Bim**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Philippe Lehmann  
geboren am 05.07.1981 in Lörrach

Gutachter:

1. Prof. Dr. Stefan Isenmann (Witten/Herdecke)
2. Prof. Dr. Christian Mawrin (Magdeburg)
3. PD Dr. Jens Weise (Jena)

Tag der öffentlichen Verteidigung: 1. Juni 2010

## Abkürzungsverzeichnis

-/-	<i>Knock-out</i>
AIDA	<i>Automatic Imaging Data Analysis</i>
AIF	<i>Apoptosis-Inducing Factor</i>
AIP	<i>Apoptosis-Inducing Protein</i>
AK	Antikörper
ANOVA	<i>Analysis Of Variance</i>
AP-1	<i>Activator protein</i>
AT <sub>1</sub> -Rezeptor	Subtyp 1 des Angiotensin II-Rezeptors
ATP	Adenosintriphosphat
Axo	Axotomie
Bad	<i>Bcl-2-antagonist of cell death</i>
Bak	<i>Bcl-2 homologous antagonist-killer protein</i>
Bax	<i>Bcl-2 associated X protein</i>
bp	Basenpaare
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-x <sub>L</sub>	<i>B-cell lymphoma x<sub>L</sub> (long isoform)</i>
BH	Bcl-2 homologe Domäne
BHS	Blut-Hirn-Schranke
Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
Bik	<i>Bcl-2 interacting killer</i>
Bim <sub>EL,L,S</sub>	<i>Bcl-2 interacting mediator of cell death, extra large, large, small</i>
Bmf	<i>Bcl-2 modifying factor</i>
Bok	<i>Bcl-2 related ovarian killer</i>
BOP	<i>BH3 Only Proteins</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CED	<i>Caenorhabditis elegans death proteins</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DCL-1	<i>Dynein light chain 1</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
ERK	<i>Extracellular signal-regulated protein kinase</i>

FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i>
FDA	<i>US Food and Drug Administration</i>
FOXO3A	<i>Forkhead box O3</i>
FPP	Farnesyl-Pyrophosphat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GGPP	Geranylgeranyl-Pyrophosphat
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
Hrk	<i>Harakiri</i>
IAP	<i>Inhibitor of Apoptosis Protein</i>
IL	Interleukin
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
IOP	<i>Intraocular pressure</i>
JKK	<i>JNK Inhibitory Kinase</i>
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
LC8	<i>Dynein light chain LC8</i>
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
Lova	Lovastatin
Mcl-1	<i>Myeloid cell leukemia sequence 1</i>
Mek	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MOMP	<i>Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n.s.	nicht signifikant
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NGS	<i>Normal Goat Serum</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
OATP	Organo-Anion-Transporter
OD	Optische Dichte
OT	Objektträger
p.o.	<i>post operationem</i>
PAI	Plasminogen Aktivator Inhibitor
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PFA	Paraformaldehyd

PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PUMA	<i>p53 Up-regulated Modulator of Apoptosis</i>
Rac	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate</i>
Raf	<i>Rapidly growing fibrosarcoma</i>
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
RGZ	Retinale Ganglienzellen
Rho	<i>Ras homolog gene family</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
Ser	Serin
Simva	Simvastatin
Smac	<i>Second mitochondria-derived activator of caspases</i>
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
Thr	Threonin
TNF	Tumornekrosefaktor
t-PA	<i>tissue-type Plasminogen Activator</i>
TRADD	<i>TNFRSF1A-Associated via Death Domain</i>
UV	Ultraviolettstrahlung
ZNS	Zentrales Nervensystem

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>3</b>
2.1 Apoptotischer Zelltod im ZNS	3
2.1.1 Extrinsische Signalkaskaden der Apoptose	5
2.1.2 Intrinsische Signalkaskaden der Apoptose	6
2.1.2.1 Bim	8
2.2 Neuroprotektion durch Statine	10
2.3 Läsion des optischen Nervs („Axotomie“)	16
<b>3. Ziele der Arbeit</b>	<b>19</b>
<b>4. Material und Methoden</b>	<b>20</b>
4.1 Versuchstiere	20
4.2 Läsion des optischen Nervs	20
4.3 Statine und Vehikellösung	21
4.4 Präparation der Augen	21
4.5 Immunhistochemie der gesamten Retina („ <i>Whole-Mounts</i> “)	22
4.6 Immunhistochemie an retinalen Gefrierschnitten	24
4.7 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion	27
4.8 Statistik	30
4.9 Material	31

<b>5.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>35</b>
5.1	Lovastatin wirkt dosisabhängig neuroprotektiv auf axotomierte retinale Ganglienzellen <i>in vivo</i>	35
5.2	Die Anzahl Bim-positiver Ganglienzellen nimmt unter Lovastatin-Behandlung ab	40
5.3	Lovastatin-Behandlung zeigt keinen Einfluss auf die Bim-Expression in der Gesamt-Retina	44
<b>6.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>46</b>
6.1	Lovastatin wirkt neuroprotektiv auf axotomierte retinale Ganglienzellen	46
6.2	Lovastatin senkt die Anzahl Bim-positiver retinaler Ganglienzellen ohne die <i>bim</i> -Expression in der Gesamt-Retina zu beeinflussen	49
<b>7.</b>	<b>Schlussfolgerungen</b>	<b>54</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>56</b>
<b>9.</b>	<b>Anhang</b>	<b>65</b>
9.1	Danksagung	65
9.2	Ehrenwörtliche Erklärung	66

## 1. Zusammenfassung

Läsionen des zentralen Nervensystems (ZNS), wie beispielsweise der Schlaganfall, führen zu einem meist irreversiblen Untergang neuronaler Zellen. Trotz vielversprechender Ergebnisse in der Grundlagenforschung ist durch schlechte Übertragbarkeit auf die klinische Anwendung die Auswahl der Therapiemöglichkeiten weiterhin eingeschränkt. Ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen von Apoptose und deren Beeinflussung durch Pharmaka kann dazu beitragen, neue, auch klinisch relevante Behandlungsansätze zu entdecken. Durch Untersuchung bereits für andere Indikationen zugelassener Medikamente auf neuroprotektive Eigenschaften lässt sich die Entwicklung bis zur klinischen Reife erheblich beschleunigen. So konnten für HMG-CoA-Reduktase-Hemmer (Statine), welche bisher vorwiegend als Cholesterinsenker eingesetzt werden, in experimentellen und klinischen Studien neuroprotektive Effekte nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung systemischer applizierter Statine *in vivo* auf apoptotische Neurone des ZNS nach Läsion untersucht. Als Versuchsmodell wurde die Axotomie des optischen Nervs angewendet, welche eine reproduzierbare Apoptose retinaler Ganglienzellen (RGZ) hervorruft. Um einen möglichen Effekt der Statintherapie auf die Apoptose retinaler Ganglienzellen nachzuweisen, wurde deren Anzahl immunhistochemisch an retinalen „*whole-mounts*“ (Explantat der gesamten Retina) bestimmt. Zusätzlich wurde immunhistochemisch an Gefrierschnitten und mit RT-PCR das pro-apoptotische Protein Bim untersucht, welches eine Schlüsselrolle am Anfang der apoptotischen Signalkaskade von RGZ einnimmt.

Eine tägliche subkutane Injektion von 8 mg/kg Lovastatin führte zu einer Besserung der Überlebensrate retinaler Ganglienzellen um 19% sieben Tage nach Axotomie. Nach einer 4-tägigen Lovastatinbehandlung kam es zu einem Abfall Bim-positiver RGZ um 27% bei axotomierten Tieren. In einer RT-PCR wurde für denselben Zeitraum keine signifikante Änderung der *bim*-Expression in der gesamten Retina durch eine Therapie mit Lovastatin gefunden.



Die Annahme, dass Statine einen neuroprotektiven Effekt auf axotomiierte retinalen Ganglienzellen haben, konnte somit bestätigt werden. Zusätzlich ließ sich ein direkter oder indirekter Einfluss auf Bim in der Immunhistochemie nachweisen. Hierfür fand sich allerdings keine Entsprechung auf Ebene der mRNA-Expression der Gesamt-Retina. Diese Ergebnisse bestätigen den hohen Stellenwert von Statinen als Neuroprotektiva in der Therapie von ZNS-Läsionen, auch wenn bezüglich der Wirkmechanismen noch Fragen offen bleiben.

## **2. Einleitung**

Nachdem über viele Jahre die Doktrin bestand, dass Schädigungen des zentralen Nervensystems (ZNS) zu einem nicht aufzuhaltenden und unwiederbringlichen Verlust neuronaler Zellen führen, wurden in den letzten Jahren zahlreiche experimentelle Möglichkeiten für neuroprotektive Therapieansätze entdeckt. Allerdings haben diese Prinzipien noch keinen Eingang in die Klinik gefunden. Somit erscheint es notwendig, die Mechanismen des neuronalen Untergangs besser zu verstehen, um alternative, praxisrelevante Ansätze zu entwickeln. Insbesondere die weitere Erforschung des apoptotischen Zelltods bietet sich hierfür an, da im Gegensatz zur Nekrose noch eine gewisse Reversibilität der zellulären Degenerationsprozesse besteht. Nachdem schon länger bekannt ist, dass Statine neben ihrer Funktion als Cholesterinsenker eine günstige Wirkung auf den Verlauf von Schlaganfällen entfalten, die über einen vasoprotektiven Effekt hinauszugehen scheint, soll in der vorliegenden Arbeit deren Wirkung auf die Apoptose retinaler Ganglienzellen (RGZ) durch Axotomie (vollständige Durchtrennung der Nervenfasern) am optischen Nerv untersucht werden. Als möglichen Ansatz für einen antiapoptotischen Wirkmechanismus der Statine soll der Einfluss auf Bim untersucht werden, einem pro-apoptotischen Signalmolekül, welches weit am Anfang der apoptotischen Signalkaskade bei untergehenden RGZ steht.

### **2.1 Apoptotischer Zelltod im ZNS**

Die Nervenzellen des zentralen Nervensystems gehören zu den langlebigsten Zellen des menschlichen Organismus und sind bis auf einen begrenzten Stammzellpool postmitotisch, wodurch einmal verlorene Neurone einen bleibenden Funktionsverlust, d.h. Schaden hinterlassen können. Dabei spielt der apoptotische Zelltod eine wichtige Rolle, welcher außer Neuronen und Gliazellen auch Vorläuferzellen im gesamten Nervensystem betrifft (Elmore 2007). Apoptose tritt auch im gesunden Organismus auf, so beispielsweise in der Ontogenese des ZNS, wo es nach einer anfänglichen Überproduktion von Neuronen zu einer Zellselektion kommt, bei welcher schätzungsweise die Hälfte der gebildeten Nervenzellen durch den

programmierten Zelltod untergehen. Gründe hierfür sind zum Beispiel die Aussonderung fehlerhafter Zellen und die Möglichkeit, flexibel ein interneuronales Netzwerk unter Berücksichtigung der gegebenen Rahmenbedingungen zu bilden (Buss und Oppenheim 2004). Aber auch im erwachsenen Organismus findet ständig Apoptose statt, um die Homöostase in den einzelnen Geweben aufrecht zu erhalten.

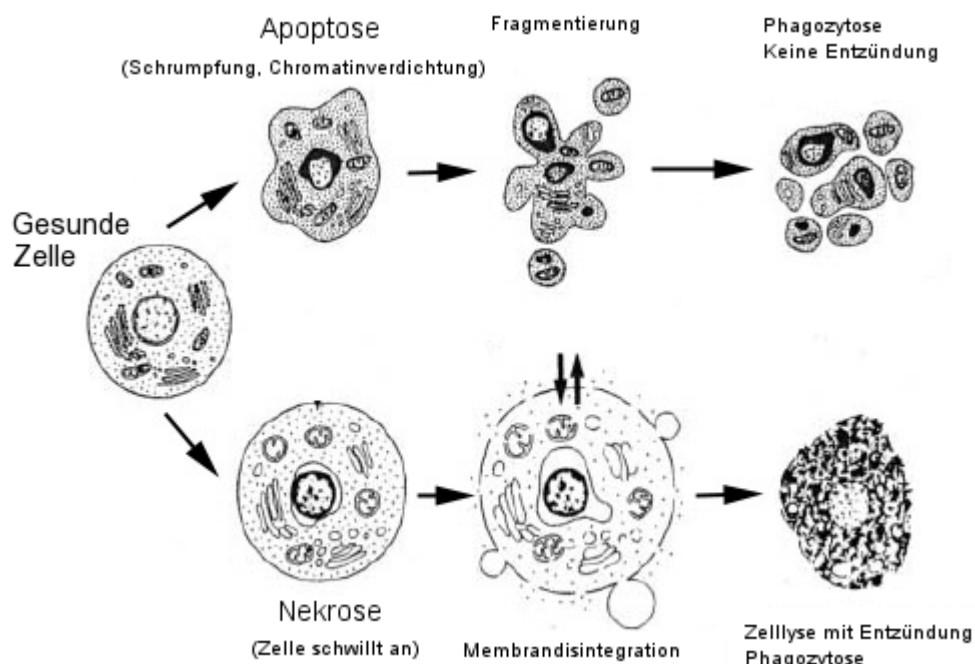
Während das Prinzip des kontrollierten Zellsterbens schon länger bekannt ist, wurde der Begriff *Apoptose* erstmals 1972 von Kerr zur Beschreibung eines durch zelleigene Mechanismen programmierten Zelltodes geprägt (Kerr et al. 1972). Der griechische Begriff αποπτωσις bedeutet soviel wie *Herunterfallen* und symbolisiert das kontrollierte Sterben der Blätter im Herbst.

Das heutige Verständnis über die grundlegenden Mechanismen der Apoptose wurde von Horvitz durch die Untersuchungen am Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* erbracht (Horvitz 1999). Hierbei zeigte er, dass während der Entwicklung des Fadenwurmes 1090 somatische Zellen gebildet werden, wovon 131 Zellen reproduzierbar eliminiert werden. Durch Mutationsanalysen konnten 13 Gene gefunden werden, die sowohl das Muster des Zelluntergangs als auch den Ablauf der Apoptose an sich festlegen. Inzwischen wurden viele in ihrer Funktion äquivalente Gene bei Säugern gefunden, wobei hier die Anzahl größer ist und sich der Ablauf komplexer gestaltet.

Ob eine Zelle durch Apoptose oder Nekrose untergeht, ist unter anderem abhängig vom intrazellulären ATP-Gehalt (Nicotera et al. 1998), wobei möglicherweise die Bildung des Apoptosoms den entscheidenden Schritt darstellt. Daher ist es möglich, dass eine einmal begonnene Apoptose wegen Energiemangels in eine Nekrose umschlägt.

Die Stadien der Apoptose sind lichtmikroskopisch sichtbar: Die Zelle beginnt zu schrumpfen und verliert ihren Kontakt zu den Nachbarzellen, das Chromatin im Zellkern verdichtet sich an der Kernmembran (*Pyknosis*) und wird fragmentiert (*Karyorrhexis*), wobei es mit dem Zytoplasma samt Zellorganellen in Vesikeln abgeschnürt wird, so genannten Apoptosekörperchen („*Budding*“). Diese werden anschließend von spezialisierten Fresszellen wie den Makrophagen phagozytiert. Eine

Entzündungsreaktion wird vermieden, indem kein Zytoplasma in die Umgebung gelangt, die Apoptosekörperchen rasch entfernt werden und keine Cytokine durch die Phagozyten gebildet werden. Der nekrotische Zelltod zeigt einen anderen morphologischen Verlauf: Die Zelle schwillt an („*oncotic necrosis*“), Zellorganellen wie Mitochondrien und Lysosomen verlieren ihre Integrität und schließlich reißt die Zellmembran und entlässt den Inhalt in die Umgebung. Dabei wird durch die freien Zellbestandteile und die Schädigung der Nachbarzellen eine entzündliche Reaktion hervorgerufen (Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Morphologie von Apoptose und Nekrose. Modifiziert nach (Gewies 2004).

Während die Nekrose vorwiegend durch pathologische Umstände ausgelöst wird und relativ unspezifisch abläuft, gibt es für die Apoptose auch physiologische Auslöser, die über komplexe Signalkaskaden zu einem präzise regulierten Zelltod führen.

### 2.1.1 Extrinsische Signalkaskaden der Apoptose

Die erste Möglichkeit, auf extrinsischem Weg einen apoptotischen Zelltod auszulösen, besteht über sog. „Todesrezeptoren“ der Tumornekrosefaktor-Superfamilie, wie FasR. Liganden hierfür sind zum Beispiel TNF oder FasL, welche nach Bindung die Trimerisierung des Rezeptors und damit über TRADD und die Bindung von FADD die Aktivierung der Caspasen 8 und 10

auslösen. Dieser Komplex aktiviert dann direkt die Endstrecke der Apoptose über Caspase 3, 6 und 7, ohne dass eine Beteiligung von Zytocrom c notwendig wäre. Über die Aktivierung von Bid gibt es die Möglichkeit eines Übergangs auf den intrinsischen Weg.

Ein weiterer extrinsischer Weg führt, zum Beispiel bei Kontakt mit viral infizierten Zellen, über die Ausschüttung von Granzym B und Perforinen durch zytotoxische T-Zellen und natürliche Killerzellen. Dabei bilden die Perforine Kanäle, die den Eintritt von Granzym B in die Zelle erleichtern. Dieses kann dann die Apoptose direkt durch Aktivierung von Caspase 3 oder indirekt über Bid auslösen (Logue und Martin 2008).

### 2.1.2 Intrinsische Signalkaskaden der Apoptose

Der intrinsische Weg wird von einer Fülle von Signalproteinen reguliert, wobei der Bcl-2 Familie eine herausragende Stellung zukommt. Seit der Entdeckung, dass Bcl-2, das funktionelle Homolog zu CED-9 bei *Caenorhabditis elegans*, die Apoptose hemmt (Vaux et al. 1988), wurden diverse andere Mitglieder und deren Funktion teilweise entschlüsselt. Die Bcl-2 Familie wird anhand ihrer konservierten homologen Bcl-2 Domänen (BH) in drei Untergruppen eingeteilt: Zur ersten Gruppe, welche die Domänen BH1-4 teilt, gehören beispielsweise die antiapoptotischen Proteine Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w, Mcl-1 und A1. Die Mitglieder der zweiten Gruppe mit den Domänen BH1-3 zählen zu den proapoptotischen Proteinen. Zu Ihnen gehören die Proteine Bax, Bak und Bok. Die letzte Gruppe enthält nur die Domäne BH3. Zu diesen ebenfalls proapoptotischen Proteinen, welche auch BOPs (*BH3-Only Proteins*) genannt werden, gehören Bim, Puma, Bid, Bik, Bad, Bmf, Hrk, und Noxa (Willis und Adams 2005).

Die BOPs werden bei Störungen der Zellhomöostase und durch zytotoxische Signale aktiviert und binden ihre antiapoptotischen Partner, wodurch die Apoptose eingeleitet wird. Über die Bax/Bak Aktivierung wird eine sogenannte MOMP (*Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*) induziert (Green und Kroemer 2004), durch die Zytocrom c ausgeschüttet und damit die Aktivierung von Apaf eingeleitet wird. Diese bilden zusammen mit dATP und Caspase 9 einen Komplex, das sogenannte „Apoptosom“, welches analog zur Caspase 8 die Endstrecke über Caspase 3 auslöst.

Neben Zytocrom c werden durch die MOMP auch andere proapoptotische Proteine wie zum Beispiel Smac/Diablo ausgeschüttet, welche IAP hemmen, oder AIF, welches unabhängig von Caspasen die Apoptose auslösen kann (Hengartner 2000).

Über das konkrete Zusammenspiel zwischen den antiapoptotischen Proteinen der Bcl-2 Gruppe und den BOPs, sowie den Mechanismen der Bax/Bak Aktivierung und deren Rolle bei der Entstehung der MOMP herrscht derzeit in mehreren Punkten Uneinigkeit. Es scheint jedoch gesichert, dass die Aktivierung von Bax und Bak für die Aktivierung des intrinsischen Wegs unabdingbar ist und sie somit eine Schlüsselposition vor der Zytocrom c Ausschüttung einnehmen. Dies konnte anhand von *bax*<sup>-/-</sup> und *bak*<sup>-/-</sup> Tieren gezeigt werden (Zong et al. 2001). Auch bei retinalen Ganglienzellen wurde nach Axotomie ein starker Bax-Anstieg vor Eintritt der Apoptose mit gleichzeitiger Abnahme von Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> gezeigt (Isenmann et al. 1997). Schwieriger wird es bei der Bedeutung des Zusammenspiels zwischen BOPs und den antiapoptotischen Proteinen, wobei es unter den BOPs deutliche Unterschiede in ihrer proapoptotischen Potenz gibt. Einen wesentlichen Einfluss scheint hierbei das unterschiedliche Bindungsverhalten der BOPs zu den antiapoptotischen Partnern zu haben. Während Bim und Puma alle antiapoptotischen Proteine der Bcl-2 Familie binden können, zeigen sich die schwächeren BOPs Bad, Bmf, Bik, Hrk und Noxa selektiv (Chen et al. 2005). Eine weitere Rolle spielt die Beeinflussung der BOPs durch transkriptionale und postranslationale Kontrolle, wie später am Beispiel von Bim erläutert wird (Puthalakath und Strasser 2002).

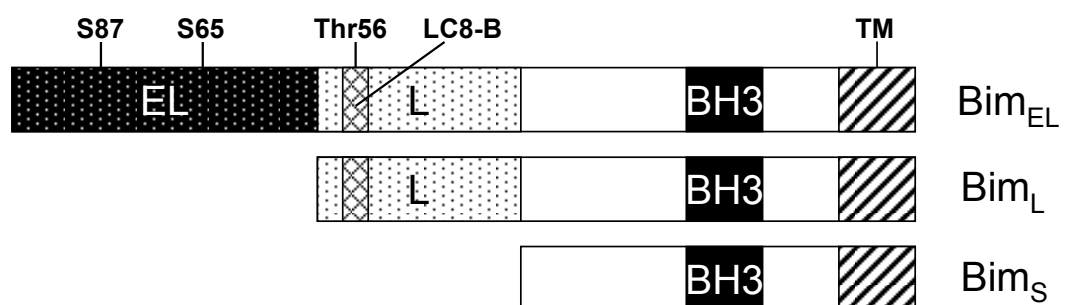
Zu klären bleibt, ob die Aktivität des zytosolischen Bax und des mitochondrialen Bak einer direkten Regelung durch bestimmte BOPs unterliegt („*Activators*“), wie es für tBid und für Bim postuliert wird, während andere BOPs lediglich die Hemmschwelle senken sollen („*Sensitizer*“), indem sie antiapoptotische Proteine binden. Alternativ ist eine indirekte Aktivierung durch die Wechselwirkung zwischen antiapoptotischen Proteinen und BOPs denkbar, wobei ein Überschuss an BOPs die Bindung zwischen antiapoptotischen Proteinen und Bax/Bak löst und diese dadurch aktiviert (Chipuk und Green 2008).

### 2.1.2.1 Bim

Seit der Entdeckung von Bim (*Bcl-2 interacting mediator of cell death*) (O'Connor et al. 1998), welches auch unter dem Namen Bod bekannt ist, wird diesem proapoptotischen Protein der BOP-Gruppe eine immer größere Rolle als eines der initiierenden Proteine der Signalkaskade des intrinsischen Weges zuerkannt. Mögliche Auslöser sind zum Beispiel der Entzug von neuronalen Wachstumsfaktoren, Exzitotoxizität, Taxol und Schädigung durch UV-Licht.

Bim wird in zahlreichen Geweben exprimiert. Im hämatopoetischen System, wo es essentiell für die Selektion der immunkompetenten Zellen ist und dadurch eine wichtige Rolle bei Autoimmunkrankheiten spielt (Bouillet et al. 1999), im Nervensystem, wo es sowohl eine fundamentale Schaltstelle beim programmierten Zelltod in der neuronalen Entwicklung als auch beim pathologischen Untergang von Neuronen (aber nicht von Glia) darstellt (Putcha et al. 2001), sowie in diversen anderen Organen (O'Reilly et al. 2000). Funktionell bildet es dabei einen Gegenspieler zu Bcl-2 (Bouillet et al. 2001).

Die Regulierung ist komplex und umfasst die Kontrolle der Transkription durch verschiedene Signalwege, alternatives Spleißen und posttranslationale Modifikationen. Die drei wichtigsten Varianten, die durch Spleißen entstehen, sind Bim<sub>EL</sub>, Bim<sub>L</sub> und Bim<sub>S</sub> (Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Spleißvarianten von Bim mit den Phosphorylierungsstellen Serin 87 für Akt, Serin 65 für ERK1/2 und Threonin 56 für JNKs. LC8-B: Bindungsstelle für LC8, TM: Hydrophobe Region für transmembranäre Bindung. Zusammengefasst von (Lei und Davis 2003, Luciano et al. 2003, O'Connor et al. 1998, Puthalakath et al. 1999, Qi et al. 2006).

Bim<sub>EL</sub> stellt dabei den quantitativ größten Anteil, gefolgt von Bim<sub>L</sub>, während sich Bim<sub>S</sub> kaum nachweisen lässt. Die proapoptotische Potenz verhält sich jedoch genau reziprok (O'Connor et al. 1998). Möglicher Grund hierfür sind die zahlreichen Ansatzpunkte, die Aktivität von Bim<sub>L</sub> und vor allem Bim<sub>EL</sub> im

Gegensatz zu Bim<sub>S</sub> über verschiedene Kontrollmechanismen modulieren zu können (Ley et al. 2005).

Ein früh entdeckter Weg der Regulierung ist die Bindung von Bim über LC8 (DCL-1) an das Zytoskelett der Zelle. Von dort wird es zusammen mit LC8 im Rahmen der Apoptose oder bei Schädigung des Zytoskeletts freigesetzt und damit aktiviert. Dies erklärt möglicherweise den Einfluss von Bim bei der Apoptose durch Störungen des Zellverbands und des intrazellulären Transports (Puthalakath et al. 1999). Eine andere Möglichkeit der Dissoziation vom Zytoskelett besteht über die Aktivierung von JNKs, welche die Möglichkeit besitzen, Bim<sub>EL</sub> und Bim<sub>L</sub> an der Bindungsstelle von LC8 zu phosphorylieren. Damit wird die Bindung an LC8 gelöst und Bim aktiviert (Lei und Davis 2003).

Auch die Expression von *bim* wird durch mehrere Wege kontrolliert. So bewirkt die Aktivierung von FOXO3A, einem Forkhead-Box Protein, eine Expressionssteigerung (Gilley et al. 2003, Dijkers et al. 2002). Auch eine Aktivierung von JNKs führt über c-Jun/AP-1 zur Zunahme von Bim (Whitfield et al. 2001).

Der antiapoptotische Signalweg über Zytokinrezeptoren durch Ras/Raf/Mek/ERK hat ebenfalls einen Einfluss auf Bim (Marani et al. 2004, Shinjyo et al. 2001, Harada et al. 2004). So wird Bim<sub>EL</sub> von ERK1/2 an Ser<sup>65</sup> (Ser<sup>69</sup> in menschlichem Bim<sub>EL</sub>) phosphoryliert (Luciano et al. 2003), was zur Dissoziation von antiapoptotischen Proteinen der Bcl-2 Familie wie Mcl-1 und Bcl-x<sub>L</sub> führt (Ewings et al. 2007b).

Unklar ist weiterhin, ob der daraus entstehende schnellere Abbau im Proteasom Folge einer erleichterten Ubiquitinierung an der Phosphorylierungsstelle oder aber das Resultat der fehlenden Bindung an antiapoptotische Proteine ist und Bim an anderer Stelle ubiquitiniert wird (Ewings et al. 2007a).

Ein weiterer Signalweg führt über Ras/PI3K/AKT, wobei Bim<sub>EL</sub> an Ser<sup>87</sup> durch Akt phosphoryliert wird. Dies führt durch Bindung an 14-3-3 Proteine zur Inaktivierung und erhöhtem Abbau. Zusätzlich wird FOXO3A über Akt phosphoryliert und dadurch inaktiviert, was eine Hemmung der *bim* Expression bewirkt (Qi et al. 2006).



Zusätzlich besteht eine Rückkopplung durch die Endstrecke der Apoptose. So führt Caspase 3 zu einem vermehrten Abbau von Bim (Wakeyama et al. 2007).

Der Mechanismus der Bax/Bak Aktivierung durch Bim ist noch nicht vollständig geklärt. Während einige nur einen indirekten Weg über Bindung von antiapoptotischen Proteinen propagieren (Willis et al. 2007), vermuten andere eine Möglichkeit der erleichterten Bindung bei Änderung der Bax-Konformation (Liu et al. 2003). Für eine direkte Aktivierung spricht die Entdeckung einer alternativen Bindungsstelle an Bax, in die eine Bim- $\alpha$ -Helix passt (Gavathiotis et al. 2008). Auch konnte eine Bindung von Bim<sub>S</sub> an Bax gezeigt werden (Marani et al. 2002).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass von allen Spleißvarianten Bim<sub>EL</sub> die wichtigste Rolle zukommt. Es wird über diverse translationale und posttranslationale Mechanismen reguliert und besitzt dadurch im Gegensatz zu den anderen weniger regulierten Spleißvarianten eine schwächere proapoptotische Potenz, die jedoch quantitativ ausgeglichen wird.

Durch seine Rolle als einer der Initiatoren der intrinsischen Signalkaskade der Apoptose bietet sich Bim als möglicher Angriffspunkt für eine neuroprotektive Therapie an.

## 2.2 Neuroprotektion durch Statine

Neuroprotektion ist ein spezielles Gebiet der zytoprotektiven Therapie in einem allgemeineren Sinn, welche zum Beispiel auch die Kardioprotektion, Nephroprotektion oder Vasoprotektion umfasst. Die genaue Definition der Neuroprotektion ist nicht immer eindeutig, da je nach untersuchtem Endpunkt die Grenzen enger oder weiter gefasst werden. So kann Neuroprotektion Therapieansätze bzw. Therapeutika umfassen, die spezifisch den Untergang von Neuronen durch direkte Mechanismen verhindern, ohne einen wesentlichen Einfluss auf deren Milieu, wie beispielsweise auf Neuroglia oder Durchblutung zu nehmen. Dies lässt sich jedoch meistens nur bei *in vitro* Versuchen sicher nachweisen. Die komplexen Interaktionen bei Tierversuchen *in vivo* sowie bei klinischen Versuchen lassen meist keinen sicheren kausalen Rückschluss auf den Wirkmechanismus zu.

Einen wesentlich praktischeren Ansatz bietet die Definition, dass Neuroprotektion alle Therapiearten umfasst, welche als Endpunkt die Erhaltung der neuronalen Funktion abgrenzen, unabhängig vom ursprünglich definierten Zielgewebe, der Verabreichungsart und der Klasse des Wirkstoffs. Diese Herangehensweise wird inzwischen vermehrt auch in der tierexperimentellen Forschung umgesetzt, jedoch ist die direkte Übertragung solcher Ergebnisse auf den Menschen schwierig, da das Nervensystem von Tieren sich funktionell deutlich vom Menschen unterscheidet und durch eine einfachere Struktur häufig auch ein größeres Regenerationspotential besitzt. Die Grundlagenforschung in diesem Bereich hat seit den 1990er Jahren deutlich zugenommen, wobei allein beim Schlaganfall über 1000 Substanzen untersucht wurden. Trotz vieler Erfolge im experimentellen Bereich sind die in klinischen Studien eingesetzten Substanzen jedoch meist erfolglos geblieben, so dass vielfach der Eindruck entsteht: *„everything works in animals but nothing works in people“* (O'Collins et al. 2006). Die Bandbreite der untersuchten Substanzen ist groß und umfasst unter anderem Antioxidantien, antiexzitatorische und antiapoptotische Substanzen, Entzündungshemmer, neurotrophe und hämatopoetische Faktoren, Eisen-Chelatoren, sowie Ansätze wie die Gentherapie und Stammzellen.

Bisher wurden lediglich zwei neuartige neuroprotektive Substanzen im engeren Sinne durch die FDA (*US Food and Drug Administration*) zugelassen (Levin und Peeples 2008): Riluzol für die amyotrophe Lateralsklerose (Bensimon et al. 1994) und Memantine für die Alzheimer-Demenz (Reisberg et al. 2003).

Ein weitaus einfacherer Ansatz als die Einführung eines neuen Wirkstoffs besteht darin, Methoden und Substanzen, die bereits für andere Indikationen am Menschen zugelassen sind, auf mögliche neuroprotektive Eigenschaften hin zu untersuchen. Aktuell befinden sich einige weitere Methoden der Neuroprotektion in der klinischen Prüfung (Ginsberg 2008), darunter die Möglichkeit, Nervenzellen durch Kühlung zu schützen (Hemmen und Lyden 2007), die Infusion hoher Dosen von humanem Albumin (Ginsberg et al. 2006) oder die präklinische Applikation von Magnesium (Saver et al. 2004).

Bei einigen Substanzen, die ursprünglich für ein anderes Einsatzgebiet konzipiert wurden, finden sich neuroprotektive Effekte. Dies gilt für

Erythropoetin, das in rekombinanter Form erfolgreich bei Anämien durch chronische Niereninsuffizienz eingesetzt wird und in experimentellen Arbeiten eine Neuroprotektion *in vivo* (Weishaupt et al. 2004), sowie eine Neuroregeneration *in vitro* bei RGZ nach Axotomie zeigte (Kretz et al. 2005). Nach einer vielversprechenden klinischen Pilotstudie beim akuten Schlaganfall (Ehrenreich et al. 2002), wurde eine multizentrische Phase II/III Studie (Multicenter Efficacy Study of Recombinant Human Erythropoietin in Acute Ischemic Stroke (ESS)) 2008 abgeschlossen, deren Ergebnisse aktuell ausgewertet werden. Ein ähnlicher Ansatz wurde in der hier vorliegenden Arbeit verfolgt, indem die neuroprotektive Wirksamkeit des Cholesterinsenkers Lovastatin untersucht wurde. Lovastatin wird bereits seit vielen Jahren erfolgreich als Cholesterinsenker zur Prophylaxe bei kardiovaskulärem Risiko verordnet und verfügt über ein gut bekanntes Wirk- und Nebenwirkungsprofil.

Bereits in den 1970er Jahren wurde entdeckt, dass bestimmte Pilzmetabolite wie Mevastatin (Compactin) (Brown et al. 1976) einen deutlich hemmenden Effekt auf die Cholesterinsynthese besitzen (Endo et al. 1976). Kurz darauf wurde Lovastatin (Mevinolin) aus *Aspergillus terreus* isoliert, welches bereits eine stärkere Hemmung als die bisherigen Metaboliten aufwies (Alberts et al. 1980) und als erstes Statin 1987 durch die FDA zugelassen wurde.

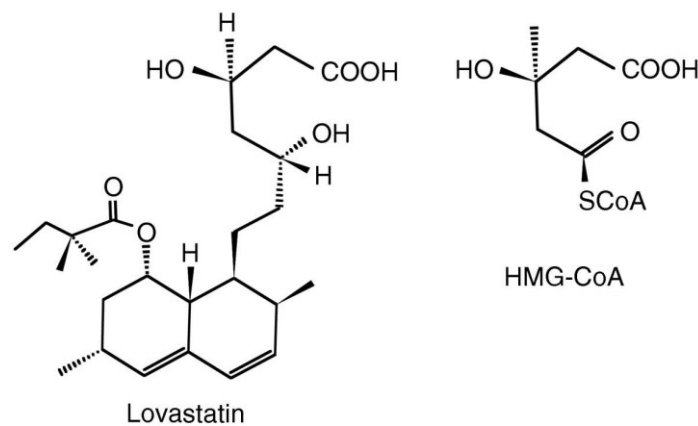
Seitdem sind eine ganze Reihe neuer Statine auf den Markt gekommen, zu denen Simvastatin, Pravastatin, Fluvastatin, Atorvastatin, Rosuvastatin und Pitavastatin gehören. Die Statine unterscheiden sich unter anderem in ihrer Herkunft, Lipophilie, Elimination, sowie ihrer Wirkung auf die LDL-Serumkonzentration (Tabelle 1) (Schachter 2005).

	Lovast.	Simvast.	Pravast.	Fluvast.	Atorvast.	Rosuvast.	Pitavast.
<b>LDL Redukt. (%)</b>	34	41	34	24	50	63	48
<b>Bioverfügbarkeit (%)</b>	5	5	18	24	12	20	~80
<b>Löslichkeit</b>	Lipoph.	Lipoph.	Hydroph.	Lipoph.	Lipoph.	Hydroph.	Lipoph.
<b>Proteinbindung</b>	>95	95-98	~50	>98	98	90	96
<b>CYP450 Metabolismus</b>	3A4	3A4		2C9	3A4	gering	gering
<b>Nierenausscheidung</b>	10	13	20	6	<5	10	?
<b>Halbwertszeit (h)</b>	3	2	1.8	1.2	14	19	11
<b>Herkunft</b>	fungal	fungal	fungal	synth.	synth.	synth.	synth.

**Tabelle 1:** Vergleich unterschiedlicher Eigenschaften der Statine (Modifiziert nach Schachter 2005).

Ihre Wirkung erreichen Statine durch kompetitive Hemmung der HMG-CoA Reduktase, dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Umwandlung von HMG-CoA zu Mevalonat, welches ein wichtiges Zwischenprodukt der Cholesterinsynthese in der Leber und anderen Geweben ist (Goldstein und Brown 1990).

Alle Statine besitzen eine Gruppe, die starke Ähnlichkeit mit HMG-CoA besitzt (Abbildung 3). Die Statine verdrängen HMG-CoA durch hydrophobe Bindung an das katalytische Zentrum der HMG-CoA Reduktase. Zusätzliche Gruppen mit alternativen Bindungsstellen erklären zum Teil die stärkere Wirkung synthetischer Statine (Istvan und Deisenhofer 2001).



**Abbildung 3:** Struktureller Vergleich zwischen Lovastatin und HMG-CoA (Friesen und Rodwell 2004).

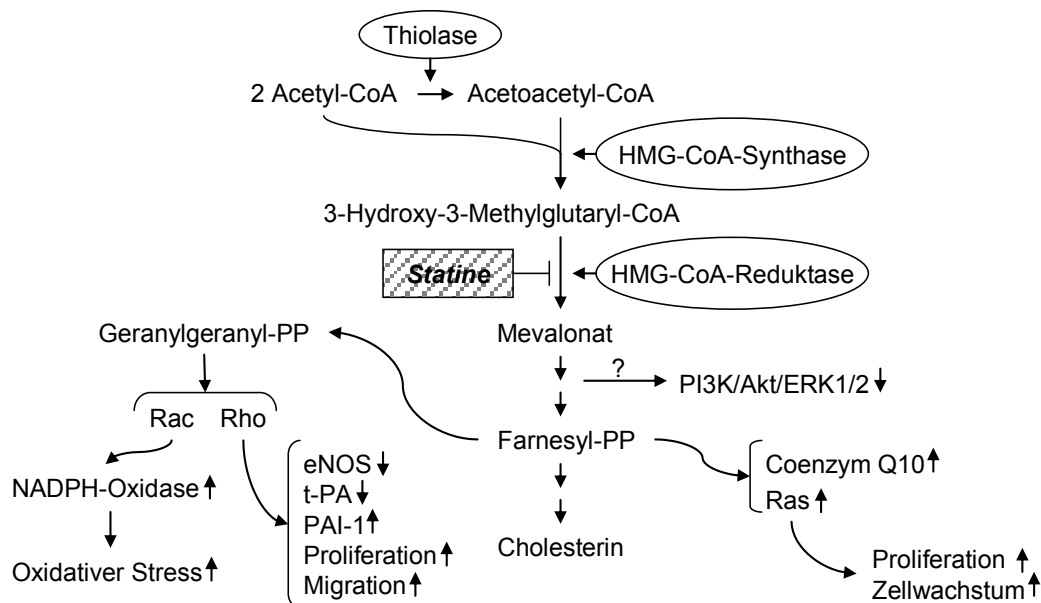
Ihre klinische Anwendung finden Statine heutzutage hauptsächlich zur Cholesterinreduktion bei Patienten mit Hyperlipidämie zur Prophylaxe bei erhöhtem kardiovaskulärem Risiko (Pedersen et al. 2004), wobei auch Patienten mit normalem Cholesterinspiegel profitieren (Sacks et al. 1996).

In einer Meta-Analyse von klinischen Studien, die einen Schlaganfall als primären oder sekundären Endpunkt hatten, zeigte sich eine deutliche Risikoverbesserung unter Statintherapie (Amarenco et al. 2004). Mit SPARCL, der ersten großen Studie zur Sekundärprophylaxe beim Schlaganfall (Amarenco et al. 2006), wurde die Effektivität der Statine bestätigt, wobei das Risiko einer intrazerebralen Blutung noch kontrovers diskutiert wird (Vergouwen et al. 2008, Woo et al. 2004).

Statine scheinen auch einen Einfluss auf chronische Erkrankungen des Nervensystems zu haben. So fand sich beim Follow-up der Rotterdam Studie eine Reduktion des Risikos für die Alzheimer'sche Krankheit bei Einnahme von Statinen, unabhängig ihrer Lipophilie. Für andere Lipidsenker ließ sich kein Effekt nachweisen (Haag et al. 2009). Auch für Multiple Sklerose zeigen zwei kleinere Studien, dass Statine möglicherweise das Fortschreiten der Krankheit bremsen können (Sena et al. 2003, Vollmer et al. 2004), wobei es jedoch möglicherweise einen negativen Effekt auf die Remyelinisierung gibt (Klopffleisch et al. 2008). Augenkrankheiten wie die altersbedingte Makuladegeneration, das chronische Offenwinkelglaukom oder die diabetische Retinopathie scheinen ebenfalls von der Statineinnahme zu profitieren (Schmeer et al. 2007).

Dieses breite Aktionsspektrum der Statine lässt sich nicht allein durch die Senkung des Cholesterinspiegels erklären. Inzwischen werden eine ganze Reihe möglicher Mechanismen, neben der direkten Hemmung der Cholesterinsynthese, für die pleiotropen Effekte der Statine verantwortlich gemacht (Abbildung 4) (Liao und Laufs 2005, Schmeer et al. 2006).

Dabei spielen bestimmte Zwischenprodukte der Cholesterinsynthese eine Rolle, indem sie Einfluss auf andere Signalwege nehmen. So wird die Bildung von Mevalonat und dadurch die Bildung von Isoprenoiden wie Geranylgeranyl-Pyrophosphat (GGPP) und Farnesyl-Pyrophosphat (FPP) gehemmt. FPP und GGPP werden für die posttranslationale Modifikation der kleinen G-Proteine wie Ras oder Rho benötigt, wobei sie die Funktion eines Lipidankers übernehmen. Ohne diesen akkumulieren die Proteine im Zytosol und bleiben inaktiviert.



**Abbildung 4:** Übersicht zum Einfluss von Statinen auf die Cholesterinbiosynthese, sowie einige der pleiotropen Effekte, welche unter anderem durch Hemmung der Isoprenylierung kleiner GTPasen entstehen (Anlehnung an Liao und Laufs 2005).

Einige der vasoprotektiven Effekte von Statinen sind durch die Hemmung der Proliferation glatter Muskelzellen (Laufs et al. 1999), die Steigerung der Expression von endothelialen NO Synthase (eNOS) (Laufs und Liao 1998) und des gewebespezifischen Plasminogenaktivators (t-PA) sowie die Hemmung der Expression von Plasminogenaktivator Inhibitor 1 (PAI-1) (Essig et al. 1998) zu erklären. Die Aktivierung von eNOS durch Statine beinhaltet möglicherweise auch den PI3K/Akt/ERK1/2 Weg (Merla et al. 2007).

Weitere protektive Effekte auf das Gefäßsystem werden durch die Suppression des AT<sub>1</sub>-Rezeptors und die Minderung reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS) durch Hemmung der NADPH-Oxidase (Wassmann et al. 2001), sowie durch Stabilisierung schon vorhandener Plaques, sowohl durch Lipidsenkung, aber auch durch Minderung der Anzahl von Makrophagen und deren Aktivität durch Hemmung von Matrix-Metalloproteinasen (MMP-2) hervorgerufen (Crisby et al. 2001).

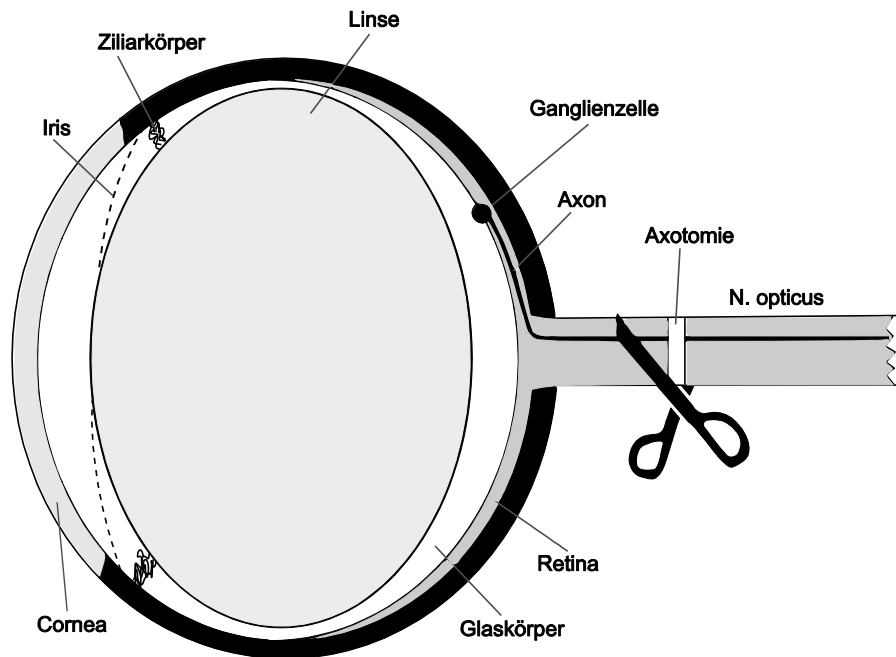
Statine haben einen deutlichen Einfluss auf das Immunsystem (Greenwood et al. 2006). Dieser wird durch zahlreiche Mechanismen, wie der Reduktion von iNOS, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 in Astrozyten, Mikroglia und Makrophagen (Pahan et al. 1997) oder durch die Hemmung von MHC-II Expression in unspezialisierten antigenpräsentierenden Zellen erklärt (Kwak et al. 2000).

Zusammenfassend lassen sich neben der direkten Cholesterinsenkung eine zusätzlich durchblutungsfördernde und entzündungshemmende Wirkung nachweisen, wobei auch eine direkte Apoptosehemmung an den Zielzellen z.B. über PI3K/Akt/ERK möglich ist. Unklar ist, welcher dieser Effekte die tragende Rolle bei der Therapie von Erkrankungen des Nervensystems einnimmt.

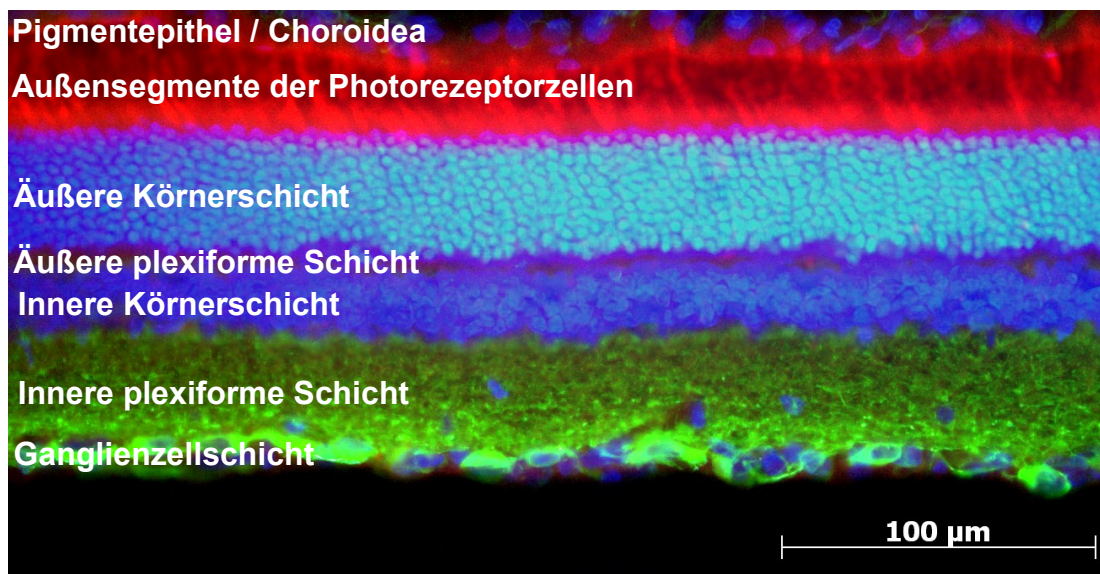
Obwohl Statine im Allgemeinen sehr gut vertragen werden, kann es auch zu unerwünschten Nebenwirkungen kommen. Neben einem Anstieg der Leberenzyme und gastrointestinalen Beschwerden treten bei unter 5% der Anwender muskuläre Beschwerden, wie Myalgie, Krämpfe oder Muskelschwäche auf. Sehr selten kann es zu einer Rhabdomyolyse bis hin zum Tod durch Nierenversagen kommen, was beispielsweise 2001 der Grund für die Rücknahme von Cerivastatin war. Die muskulären Nebenwirkungen werden zum Teil auf eine Minderung des Coenzym Q10 (Ubiquinon) durch Statine zurückgeführt, wobei der Zusammenhang bisher nicht sicher belegt wurde (Marcoff und Thompson 2007). Auch ob eine Nahrungsergänzung mit Q10 sinnvoll ist, bleibt ungeklärt. Andere beschriebene Nebenwirkungen sind Hautreaktionen, Depressionen und erektile Dysfunktion.

### **2.3 Läsion des optischen Nervs („Axotomie“)**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Apoptose retinaler Ganglienzellen durch das Modell der Axotomie am Nervus opticus untersucht (Abbildung 5). Dieses Versuchsmodell hat sich bereits seit Jahren für die Untersuchung molekularer Mechanismen der Apoptose und diverser neuroprotektiver und neuroregenerativer Therapien im zentralen Nervensystem bewährt (Berry et al. 2008, Isenmann et al. 2003, Weishaupt und Bähr 2001). Vorteile sind dabei, dass Manipulationen am Auge und am optischen Nerv ohne großen Aufwand möglich sind und die Retina über einen klar geschichteten Aufbau verfügt (Abbildung 6).



**Abbildung 5:** Schematischer Aufbau des Auges einer Ratte mit Axotomie des N. opticus.



**Abbildung 6:** Ausschnitt einer unbehandelten Retina einer Ratte mit Darstellung des Schichtaufbaus. Grün: Anti- $\beta$ -III-Tubulin / Alexa 488, rot: Anti-Bim / Cy3, blau: DAPI.

Zusätzlich bedeutet die am innersten gelegene retinale Ganglienzellschicht als nahezu zweidimensionale Struktur eine wesentliche Vereinfachung bei der Auswertung gegenüber den deutlich komplexer aufgebauten Hirnanteilen. Dennoch lassen sich viele Fragestellungen bezüglich des ZNS an der Retina untersuchen, da sie zusammen mit dem optischen Nerv als Ausstülpung des Diencephalons viele Eigenschaften mit diesem teilt. So können sich bei Säugetieren einmal differenzierte RGZ nicht mehr teilen und sie zeigen nach Schädigung ähnliche Regenerationsschwierigkeiten wie



ZNS-Neurone. Auch hinsichtlich der Gliapopulationen bestehen Gemeinsamkeiten. So gibt es Astrozyten und Mikroglia, sowie im optischen Nerv ab der Lamina cribrosa Oligodendrozyten, welche eine intakte Blut-Hirn-Schranke bilden. Die Axone im optischen Nerv entspringen ausschließlich aus RGZ und dieser wird wie das übrige ZNS ebenfalls von Liquor cerebrospinalis umspült und von Meningen umgeben.

Die Vorteile der sog. „Axotomie“ sind eine komplette Durchtrennung aller Axone von RGZ, ohne deren Zell-Somata selbst direkt zu schädigen. Im Gegensatz zum Menschen verläuft die A. retinalis beim Nager nicht innerhalb des optischen Nervs, sondern in der Dura. Da der optische Nerv unter Sicht innerhalb der Dura durchtrennt wird, ist die Verletzungsgefahr der A. retinalis minimiert und damit die Möglichkeit eines unspezifischen bzw. unkontrollierten Gewebeuntergangs durch Ischämie unwahrscheinlich. Auch ist die Anzahl untergehender RGZ bei Axotomie sehr gut reproduzierbar.

Sieben Tage nach Axotomie gehen ca. 50% und nach 14 Tagen über 90% der Zellen unter, wobei die Entfernung der Läsion zur Retina einen gewissen Einfluss hat (Berkelaar et al. 1994, Kretz et al. 2006). Es konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu anderen Modellen die meisten RGZ bei Axotomie durch Apoptose untergehen (Garcia-Valenzuela et al. 1994), wobei die Unversehrtheit des Augapfels und der Blutversorgung die Wahrscheinlichkeit einer Nekrose minimieren.

Es gibt verschiedene Applikationswege für Neuroprotektiva am Auge. Der direkteste Weg ist die intraokuläre Injektion in den Glaskörper, zwischen Linse und Retina. Hierbei besteht jedoch die Gefahr, die Linse zu beschädigen, was selbst einen neuroprotektiven Effekt hat (Fischer et al. 2000) und dadurch das Ergebnis beeinflusst. Ein anderer Weg ist die Verabreichung über den proximalen Nervenstumpf. Dies ist jedoch für mehrmalige Anwendung nicht praktikabel. Die dritte und praktischste Alternative ist der systemische Weg. Hier ist ohne Probleme eine wiederholte Applikation möglich und die Substanzen können bei vorhandener Durchblutung bis an die Retina gelangen, ohne dass jedes Mal direkt am Auge manipuliert werden muss, was weitere Störfaktoren ausschließt. Die reduzierte Bioverfügbarkeit vor Ort erfordert jedoch eine Dosissteigerung mit dem Risiko einer erhöhten Nebenwirkungsrate.

### 3. Ziele der Arbeit

Apoptose ist ein wichtiger Pathomechanismus bei einer Vielzahl neuronaler Erkrankungen wie zum Beispiel dem Schlaganfall. Trotz der Bekanntheit dieser Tatsache gibt es noch viele offene Fragen bezüglich der zugrunde liegenden zellulären Kaskaden, welche möglicherweise neue Ansatzpunkte für eine Therapie beinhalten. Die Notwendigkeit, diese näher zu erforschen und bereits vorhandene Medikamente auf deren Wirkung hin zu überprüfen ist offensichtlich. Dafür eignet sich besonders das in dieser Arbeit verwendete Versuchsmodell der Axotomie des optischen Nerven. Es beinhaltet einen selektiven, fast ausschließlich apoptotischen Zelluntergang retinaler Neurone. Gleichzeitig gewährt dieses Modell eine ausgezeichnete Reproduzierbarkeit. Durch die Möglichkeit der systemischen Applikation von Testsubstanzen *in vivo* wird zudem eine möglichst große Nähe zu klinischen Bedingungen hergestellt.

Ziel dieser Arbeit ist es, die bereits an anderen Tiermodellen demonstrierte neuroprotektive Wirkung von verschiedenen Statinen auf axotomierte retinale Ganglienzellen zu untersuchen. Sollte sich auch hier eine positive Wirkung durch Statine nachweisen lassen, wäre in einem nächsten Schritt der mögliche Einfluss dieses Effekts auf das proapoptotische Protein Bim zu ermitteln, welches eine wichtige Stellung beim Zelluntergang von retinalen Ganglienzellen nach Axotomie einnimmt. Dazu soll sowohl auf immunhistochemischer Ebene eine Quantifizierung Bim-positiver Zellen erfolgen als auch auf Expressionsebene durch RT-PCR eine mögliche Wirkung auf die *bim*-mRNA untersucht werden.

## **4. Material und Methoden**

### **4.1 Versuchstiere**

Alle Tierversuche wurden an adulten weiblichen Sprague Dawley Ratten (Charles River, Sulzfeld) mit einem Körpergewicht von 230 g bis 300 g durchgeführt (entspricht etwa einem Alter von 3 Monaten), wobei der maximale Unterschied innerhalb der Versuchsgruppen 40 g betrug. Die Tiere wurden bei konstanter Temperatur und Luftfeuchtigkeit mit einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden mit Wasser und Trockenfutter ad libitum gehalten. Alle Tierversuche wurden durch dafür qualifizierte Personen im Rahmen eines vom Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz genehmigten Tierversuchsvorhabens unter Einhaltung der Bestimmungen durchgeführt.

### **4.2 Läsion des optischen Nervis**

Die Anästhesie erfolgte mit 7% Chloralhydrat in PBS, welches gewichtsadaptiert (420 mg/kg) intraperitoneal injiziert wurde. Zusätzlich erfolgte eine Lokalanästhesie mit einem Tropfen Conjuncain® am zu operierenden Auge. Anschließend wurde das Tier unter ein Operationsmikroskop (Leica, Wetzlar) gebracht. Das obere und untere Augenlid wurde jeweils mit chirurgischem Nahtmaterial seitlich fixiert, um das Auge während der Operation offen zu halten. Danach wurde das Auge mit einer gebogenen Pinzette leicht nach vorne luxiert, um die Konjunktiva am hinteren Augenabschnitt im unteren temporalen Bereich mit einer Schere zu eröffnen. Die Eintrittspforte wurde stumpf mit einer Pinzette erweitert und ein Weg zwischen den Augenmuskeln zum optischen Nerv geschaffen. Dabei wurde versucht, möglichst keine der Venae orbitae zu verletzen, um nicht die Sicht durch venöse Blutungen zu erschweren. Die Dura wurde 2 - 3 mm hinter dem Augenpol mit einer kleinen Schere für ca. 1 - 2 mm längs aufgespreizt, wobei unter Sicht die in der Dura verlaufende A. retinalis geschont wurde. Durch die Öffnung wurde der N. opticus innerhalb der Dura quer durchgeschnitten. Mit Hilfe eines kleinen Hakens wurden nicht erfasste Anteile des optischen Nervis stumpf durchtrennt. Nach erfolgreicher Operation wurde das Auge mit Floxal® Augentropfen behandelt, um das

Risiko einer Infektion zu minimieren. Abschließend wurde der Augenhintergrund mit einem Objektträger untersucht, um eine Durchblutungsstörung der A. retinalis und damit eine retinale Ischämie auszuschließen. Es wurde immer nur das linke Auge operiert, das rechte blieb unbehandelt (Kretz et al. 2006).

#### **4.3 Statine und Vehikellösung**

Zunächst wurden 25 mg Lovastatin als Reinsubstanz mit 1 ml Ethanol und 0,813 ml 1N NaOH in Lösung gebracht, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Vor Verwendung wurden die einzelnen Dosen nach dem Auftauen bei Raumtemperatur mit HCl auf pH 7,2 titriert. Simvastatin wurde auf dieselbe Weise vorbereitet, mit dem Unterschied der Verwendung von 50 mg statt 25 mg aufgrund der besseren Löslichkeit. Die Herstellung der Vehikellösung blieb bis auf die Statinzugabe gleich. Für die täglichen Injektionen der Versuchstiere wurde eine Kurznarkose mit einem Gemisch aus Isofluran 3 Vol.-%, 40 l/h Lachgas und 20 l/h Sauerstoff für 3 Minuten in einem Glaszylinder durchgeführt. Anschließend wurden Medikament oder Vehikel nach Anheben der inguinalen Bauchhaut subkutan appliziert. Die Injektionsstelle wurde täglich gewechselt, um Irritationen an der Punktionsstelle zu vermeiden. Die erste Injektion erfolgte direkt nach der Operation, die täglichen Folgeinjektionen immer etwa zur gleichen Tageszeit; die letzte Injektion erfolgte am Tag vor Versuchsende.

#### **4.4 Präparation der Augen**

Die Versuchstiere wurden je nach Versuchsreihe am 4. oder 7. Tag durch Verabreichen von 30% Chloralhydrat intraperitoneal getötet. Danach wurde das operierte Auge, ohne eine Läsion an der Sklera zu setzen, mit einer an den Spitzen abgerundeten Schere aus der Cavitas orbitalis herausgetrennt. Es erfolgte eine kurze Säuberung in PBS. Danach wurden die Augen je nach Versuch in eine Petrischale mit 4% PFA (für nachfolgende immunhistologische Untersuchungen) oder PBS (für RNA-Proben) zur Präparation unter ein Stereomikroskop (Zeiss, Jena) gebracht.

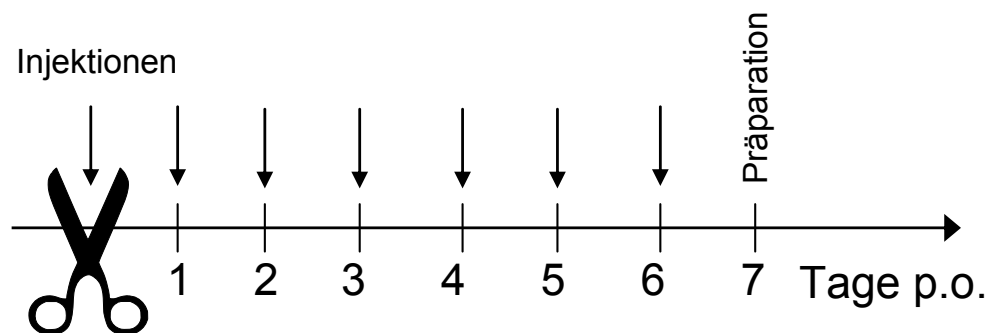
Nach Entfernen abstehender Bindegewebsanteile und Muskelansätze wurde mit einer Kanüle kurz unterhalb des Limbus corneae ein Zugang geschaffen,

durch den mit einer kleinen Schere Kornea samt Iris kreisförmig entfernt wurden. Bei der Entnahme der Linse wurde versucht, den anhaftenden Glaskörper restlos mit zu entfernen, was vor allem für die Immunhistochemie wichtig ist, da ansonsten der Zugang der Antikörperlösungen an die Retina erschwert wird.

#### 4.5 Immunhistochemie der gesamten Retina („Whole-Mounts“)

##### Behandlung

Die axotomierten Tiere wurden vom Tag der Operation bis zum Tag vor Entnahme der Augen täglich mit Statinen behandelt (Abbildung 7). Die Vehikelgruppe erhielt dieselbe Behandlung. Tiere in der nicht behandelten Gruppe bekamen keine Injektionen. Die Kontrollgruppe blieb ohne Axotomie und wurde direkt präpariert.



**Abbildung 7:** Behandlungsschema für axotomierte Tiere der Whole-Mount-Gruppe. Schere = Axotomie, p.o. = post operationem.

##### Immunhistochemie der *whole-mount*-Präparate

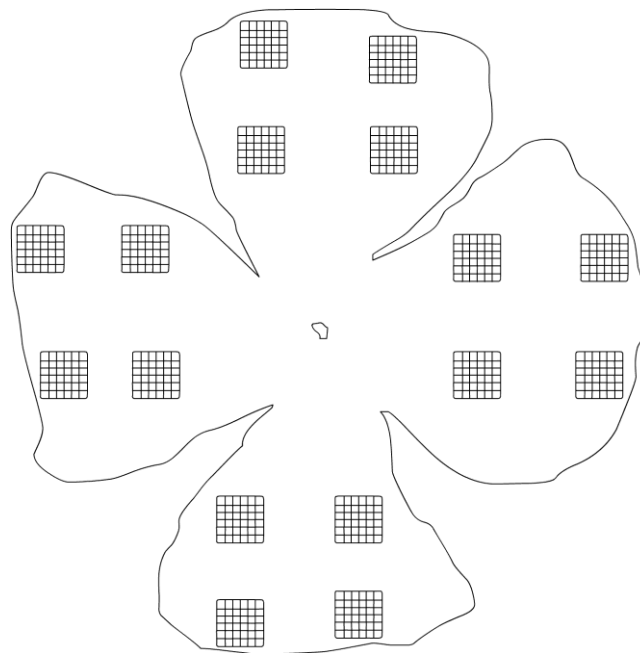
Die entnommenen Augen wurden sowohl während der Präparation als auch für weitere 20 Minuten danach in 4% PFA fixiert. Nach dreimaligem Waschen für 5 Minuten in PBS wurde der Augenbecher 2 Stunden lang bei Raumtemperatur mit 10% NGS Lösung blockiert. Nach Entfernung der Blockierungslösung wurde ohne weiteren Waschschrift der 1. Antikörper Maus-anti- $\beta$ III-Tubulin im Verhältnis 1:500 in 2% NGS Lösung aufgetragen. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur wurde der Augenbecher dreimal für 5 Minuten mit PBS gewaschen und für eine weitere Stunde mit dem 2. Antikörper Ziege-anti-Maus Alexa Fluor® 488 im Verhältnis 1:500 in 10% NGS Lösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für 5 Minuten

wurde unter einem Stereomikroskop (Zeiss, Jena) die Retina in PBS vorsichtig stumpf mit zwei Pinzetten vom Augenbecher getrennt.

Um der fixierten Halbkugel die Spannung zu nehmen und die spätere Orientierung zu erleichtern, wurden kleeblattförmig Schnitte gesetzt und die Retina mit zwei Pinseln auf einem Objektträger platziert. Zur Stabilisierung der Fluoreszenz und zur besseren Konservierung wurde die Retina mit einem Tropfen Glycerol in PBS 1:1 unter ein Deckglas gebracht und zur Vermeidung von Verdunstung rundum mit Nagellack abgedichtet (Schmeer et al. 2008).

### Auswertung der *whole-mount*-Präparate

Für die Auswertung der *whole-mount*-Präparate wurde eine Modifikation des von Isenmann et al. (Isenmann et al. 1998) beschriebenen Verfahrens zur Auszählung von RGZ verwendet. Die Präparate wurden in ein mit Fluoreszenzlampe ausgestattetes Mikroskop (Zeiss, Jena) gebracht, in dessen Okular ein quadratisches Zählgitter mit 10x10 Kästchen und 1,25 cm Seitenlänge platziert wurde. Da die Faserdichte zum Zentrum der Retina an Dichte zunimmt und dadurch ein sicheres Erkennen aller RGZ nicht mehr in jedem Fall möglich ist, wurde etwa bei der Hälfte und am Rand eines retinalen „Blattes“ gezählt. Dabei wurden für jedes der vier „Blätter“ vier Bereiche bei 400x Vergrößerung gezählt (Abbildung 8).



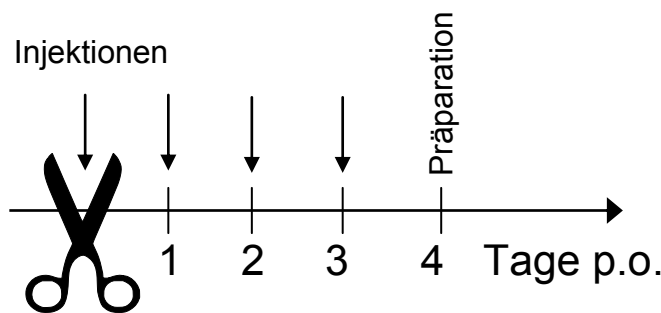
**Abbildung 8:** Schema einer präparierten Retina („*Whole-Mount*“) mit Zählfeldern.

Das Ergebnis wurde für den jeweiligen Bereich gemittelt und mit dem Korrekturfaktor 10,2 multipliziert, um einen Wert „RGZ pro mm<sup>2</sup>“ zu erhalten, welcher die Vergrößerung einbezieht und einen direkten Vergleich mit anderen Arbeiten erlaubt. Von einer durchschnittlichen Retinafläche von 40,5 mm<sup>2</sup> einer drei Monate alten Ratte (Harman et al. 2003) wurden jeweils ca. 4% der gesamten Retina ausgewertet.

#### 4.6 Immunhistochemie an retinalen Gefrierschnitten

##### Behandlung

Es wurde dasselbe Injektionsschema wie bei den *Whole-Mounts* angewandt, mit dem Unterschied, dass die Tiere statt 7 Tagen lediglich 4 Tage behandelt wurden (Abbildung 9).



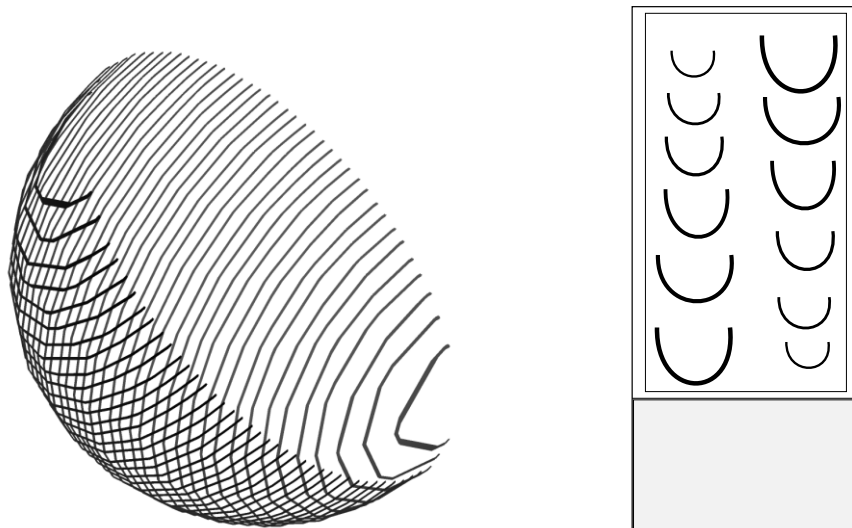
**Abbildung 9:** Behandlungsschema für axotomierte Tiere der Gefrierschnitt-/ RT-PCR-Gruppe. Schere = Axotomie, p.o. = post operationem.

##### Einfrieren der präparierten Augen

Die Augen wurden nach der Präparation wie bei den *Whole-Mounts* fixiert und in PBS gewaschen. Anschließend wurde der Augenbecher über Nacht in 30% Saccharose gelagert, um spätere Frostschäden zu vermeiden. Am nächsten Tag wurde der Augenbecher mit Tissue-Tek<sup>®</sup> (Sakura, Zoeterwoude) überzogen und in einen kleinen Plastikdeckel als Träger platziert. Durch langsames Eintauchen in flüssigen Stickstoff wurde der Augenbecher vorsichtig blasenfrei durchgefroren. Nach Markierung der Position der Becheröffnung wurde der gefrorene Augenbecher bei -20°C gelagert.

### Anfertigung der Schnitte im Gefriermikrotom

Der gefrorene Augenbecher wurde zunächst aus dem Plastikdeckel gelöst und mit etwas Tissue-Tek® auf einer Trägerscheibe des Gefriermikrotoms (Leica, Wetzlar) fixiert. Danach wurde die Trägerscheibe so in die Schneidevorrichtung montiert, dass das Schneidemesser möglichst waagrecht auf die markierte Öffnung des Augenbechers zeigt. Nach grober Trimmung des Präparates wurden im halbautomatischen Verfahren Schnitte mit 16µm Dicke angefertigt und auf Objektträger (OT) platziert. Hierbei wurde jeder Schnitt nacheinander auf abwechselnd 24 OT gebracht. Wenn der letzte OT bestückt war, wurde wieder beim Ersten angefangen. Schließlich befand sich auf jedem OT etwa jeder 24. Schnitt mit insgesamt 12 Schnitten pro OT (Abbildung 10). Nach Trocknen der Schnitte bei 37°C auf einer Wärmeplatte (Grant, Cambridgeshire) wurden sie bei -20°C gelagert.



**Abbildung 10:** Schema eines geschnittenen Augenbechers mit anschließender Anordnung der Schnitte auf einem der 24 Objektträger.

### Immunhistochemie der retinalen Gefrierschnitte

Die gefrorenen OT wurden in einem Wärmeschrank (Memmert, Schwabach) bei 37°C 45 Minuten lang getrocknet. Die anschließende Fixation erfolgte für 20 Minuten in einer Küvette mit 4% PFA. Nach dreimaligem Waschen in PBS für jeweils 5 Minuten, wurden die OT in eine feuchte Kammer gebracht und 2 Stunden mit 10% NGS Lösung blockiert. Nach kurzem Abschütteln der Blockierlösung wurden die primären Antikörper (AK) für 1 Stunde aufgetragen. Anti-βIII-Tubulin und Bim wurden hierfür im Verhältnis 1:500



bzw. 1:200 in 2% NGS Lösung gebracht (Tabelle 2). Nach einem weiteren Waschvorgang in PBS wurden die sekundären AK Alexa 488 und Cy3 je 1:500 in 10% NGS für 1 Stunde aufgetragen (Tabelle 3). Darauf folgte nach einer weiteren Waschung eine 5-minütige Inkubation der OT in DAPI-Lösung zur Färbung der Zellkerne. Anschließend wurden die OT ein letztes Mal gewaschen und in Mowiol eingedeckelt. Nach dem Trocknen der OT bei Raumtemperatur wurden diese vor der Auswertung bei 4°C aufbewahrt.

Bezeichnung	Spezies	Antigen	Hersteller	Verdünnung
Anti- $\beta$ III-Tubulin (TUJ1) monoklonaler AK	Maus	Klasse III $\beta$ - Tubulin in Neuronen	Covance	1:500
Bim polyklonaler AK	Kaninchen	Bim <sub>S</sub> , Bim <sub>L</sub> , Bim <sub>EL</sub>	Cell Signaling	1:200

**Tabelle 2:** Auflistung der primären Antikörper für die Immunhistochemie

Bezeichnung	Spezies	Hersteller	Verdünnung
Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 anti-Maus	Ziege	Molecular Probes	1:500
Cy3 anti-Kaninchen	Ziege	Molecular Probes	1:500

**Tabelle 3:** Auflistung der sekundären Antikörper für die Immunhistochemie

### Auswertung der Gefrierschnitte

Die gefärbten Schnitte wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop bei 400-facher Vergrößerung ausgewertet. Dabei wurden, um einen repräsentativen Querschnitt zu zählen, jeweils der erste und der mittlere OT einer Reihe ausgewertet, also bei 24 OT zum Beispiel der 1. und 13. OT. Die Schnitte wurden jeweils komplett ausgezählt. Zusätzlich wurde an einigen Stellen stichprobenartig untersucht, ob Bim-positive Ganglienzellen sowohl mit der Anti- $\beta$ III-Tubulin, als auch mit der DAPI-Färbung überlappten.

#### **4.7 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)**

##### **Behandlung**

Die Behandlung der Tiere erfolgte wie für die Gefrierschnitte.

##### **Präparation der Retinae**

Die entnommenen Augen wurden in PBS präpariert. Danach wurde die Retina in einem leeren Eppendorfröhrchen mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

##### **RNA-Extraktion**

Die RNA-Extraktion erfolgte mit einem RNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden). Die unten genannten Puffer (RLT, RW1, RDD, RPE) sind Bestandteile dieses Kits. Vorbereitend wurde 1 ml RLT Puffer mit 10 µl 2-Mercaptoethanol gemischt. Nach Zugabe von 350 µl RLT Puffer / 2-Mercaptoethanol Gemisch zur Retina, wurde diese mit einem Homogenisator (Art-Micra, Müllheim) für ca. 20 Sekunden zerkleinert und auf Eis gestellt. Zwischen den einzelnen Proben wurde der Stab des Homogenisators mit RLT Puffer / 2-Mercaptoethanol Gemisch gespült. Als Nächstes wurden die Proben 3 Minuten mit 10.000 U/min in einer Zentrifuge (Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert und der Überstand mit einer Pipette in ein neues 1 ml Eppendorf-Röhrchen gegeben. Jede Probe wurde mit 350 µl 70% Ethanol versetzt und mit der Pipette gut vermischt, bis die Konsistenz visköser wurde. Nach Auftragen der Proben auf Trennsäulen wurden diese bei 10.000 U/min für 15 Sekunden zentrifugiert und die abzentrifugierte Flüssigkeit verworfen. Anschließend wurden 350 µl RW1 Puffer aufgetragen, 15 Sekunden bei 10.000 U/min zentrifugiert und die abzentrifugierte Flüssigkeit verworfen. Zur Elimination von DNA-Anteilen wurden pro Säule 10 µl DNase-I und 70 µl RDD Puffer aufgetragen und bei Raumtemperatur 15 Minuten inkubiert. Danach wurden 350 µl RW1 Puffer aufgetragen, 15 Sekunden bei 10.000 U/min zentrifugiert und die abzentrifugierte Flüssigkeit verworfen. Im Folgenden wurden 500 µl RPE Puffer auf die Säulen gegeben, 15 Sekunden bei 10.000 U/min zentrifugiert und die abzentrifugierte Flüssigkeit verworfen. Dann wurden 500 µl 80% Ethanol aufgetragen und 2 Minuten bei 10.000

U/min zentrifugiert. Nach Umsetzen der Säulen auf neue Eppendorf-Röhrchen wurde bei offenem Säulendeckel für 5 Minuten bei 13.200 U/min zentrifugiert. Zuletzt wurden die Säulen auf die endgültigen Eppendorfröhrchen platziert, 14 µl RNase-freies Wasser aufpipettiert und bei 13.200 U/min 1 Minute zentrifugiert. Die RNA wurde anschließend bei -80°C aufbewahrt.

### **Bestimmung der RNA-Konzentration und cDNA Synthese**

Die Bestimmung der RNA-Konzentration der einzelnen Proben erfolgte am NanoDrop 1000 (Pepqlab, Erlangen). Dafür wurde 1 µl der extrahierten RNA aufgetragen und über die Lichtabsorption die Konzentration bestimmt. Hierfür verwendet die Software eine modifizierte Gleichung nach Lambert-Beer:  $c = (A * e) / b$ . Dabei ist c die Konzentration der Nukleinsäuren in ng/µl, A die Absorption, e der Koeffizient in 40 ng\*cm/µl und b die Strecke. Es wird einmal bei 1 mm und bei 0,2 mm gemessen. Je nach Konzentration wurde die entsprechende RNA-Menge mit RNase-freiem Wasser auf 15 µl in ein Eppendorfröhrchen aufgefüllt. Die cDNA Synthese erfolgte mit einem iScript cDNA Synthese Kit (Bio-Rad, München). In das Eppendorfröhrchen mit der gelösten RNA wurden 4 µl 5x iScript Reaktionsmix und 1 µl iScript reverse Transkriptase hinzugegeben. Nach kurzem Abzentrifugieren wurden die Proben in einen Thermocycler (Biometra, Göttingen) gestellt und folgendes Programm benutzt (Tabelle 4):

Schritt 1	25°C	300s
Schritt 2	42°C	1800s
Schritt 3	85°C	300s
Schritt 4	4°C	Pause

**Tabelle 4:** Thermocyclerprogramm für die cDNA-Synthese

Die synthetisierte cDNA wurde anschließend bei -20°C aufbewahrt.

## RT-PCR

Die Sequenz der verwendeten Bim-Primer wurde aus einer Arbeit von Yao et al. übernommen (Yao et al. 2007): Bim s: 5'-GCC CCT ACC TCC CTA CAG AC-3', Bim as: 5'-CAG GTT CCT CCT GAG ACT GC-3'. Die Primer-Synthese erfolgte extern (MWG, Ebersberg). Zusätzlich wurde zur Kontrolle der Probenhomogenität eine RT-PCR auf das *Housekeeping*-Gen GAPDH durchgeführt: GAPDH s: 5'-TCC CTC AAG ATT GTC AGC AA-3', GAPDH as: 5'-AGA TCC ACA ACG GAT ACA TT-3' (Biomers.net, Ulm). Zuerst wurden die Primer mit RNase-freiem Wasser entsprechend der Herstellerangaben auf 100 pmol/µl aufgelöst und danach in einem weiteren Röhrchen im Verhältnis 1:10 verdünnt. Pro PCR-Röhrchen wurden je 1 µl cDNA, 10 µl MasterMix (Eppendorf, Hamburg), 1 µl Vorwärts-Primer, 1 µl Rückwärts-Primer und 12 µl RNase-freies Wasser hinzugesetzt. Nach kurzem abzentrifugieren wurden die Proben in den Thermocycler (Biometra, Göttingen) gestellt und folgende Programme benutzt (Tabellen 5, 6):

Schritt 1	94°C	240s
Schritt 2	94°C	45s
Schritt 3	59°C	45s
Schritt 4	72°C	60s
Schritt 5	72°C	600s
Schritt 6	4°C	Pause

← 39 Zyklen

**Tabelle 5:** Thermocyclerprogramm für die GAPDH-PCR

Schritt 1	95°C	60s
Schritt 2	95°C	30s
Schritt 3	60°C	30s
Schritt 4	72°C	60s
Schritt 5	72°C	300s
Schritt 6	4°C	Pause

← 30 Zyklen

**Tabelle 6:** Thermocyclerprogramm für die Bim-PCR

### **Gelelektrophorese**

Für das 1,5% Agarose-Gel wurden 200 ml TBE-Puffer mit 3 g Agarose in eine 500 ml Glasflasche gegeben. Das Gemisch wurde für 2 Minuten in einem handelsüblichen Mikrowelleherd (Bosch, Gerlingen) bei 900W erhitzt, kurz geschwenkt und nochmals bis zum Erreichen des Siedepunktes erhitzt. Dieser Vorgang wurde bis zur vollständigen Auflösung der Agarose wiederholt. Danach wurde das Gemisch bei Raumtemperatur abgekühlt bis es etwa handwarm war. Nach Zugabe von 6 µl Ethidiumbromid wurde das flüssige Gel in eine Agarose-Kammer mit eingehängtem Kamm gegossen ohne Luftblasen zu erzeugen. Nach Aushärtung des Gels wurde der Kamm entfernt und die Agarose-Kammer in die Gelelektrophorese-Vorrichtung platziert und mit TBE-Puffer überschichtet. Auf Parafilm (Pechiney Plastic Packaging, Chicago) wurden entsprechend der Probenanzahl stecknadelkopfgroße Mengen von *Loading Buffer* (Fermentas, St. Leon-Rot) aufgetragen. Dann wurde in die erste Geltasche 6 µl *Ladder-Mix* (Fermentas, St. Leon-Rot) aufgetragen. Jeweils 10 µl der Proben wurden auf dem Parafilm mit Ladepuffer vermischt und in die weiteren Taschen aufgetragen. Danach wurde die Elektrophorese mit einer konstanten Spannung von 100 V gestartet und für circa 1,5 Stunden laufen gelassen bis die Farbmarkierung des Ladepuffers vor den Proben etwa die Hälfte des Gels erreicht hatte.

### **Aufnahme und Auswertung Gele**

Das Agarosegel wurde nach der Elektrophorese auf einen UV-Tisch in eine Dunkelkammer gebracht und mit einer Digitalkamera aufgenommen (Intas, Göttingen). Anschließend wurde die optische Dichte der einzelnen Banden mit der AIDA-Software (Raytest, Straubenhardt) ausgemessen.

### **4.8 Statistik**

Den Versuchsgruppen wurden immer eine Kontrollgruppe mit unbehandelten Tieren und eine Vehikelgruppe gegenübergestellt, die lediglich mit der Trägerlösung des Wirkstoffs behandelt wurde. Es wurden zwischen 4 und 7 Tiere pro Gruppe verwendet. Für jede Versuchsgruppe wurden die Mittelwerte gebildet und die Standardabweichung berechnet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von SPSS 15.0 (SPSS, Chicago) über eine ANOVA

(*analysis of variance*) mit *post hoc* Bonferroni-Korrektur (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

## 4.9 Material

### Lösungen

10x PBS:	80,06 g	NaCl	(Roth, Karlsruhe)
	2 g	KCl	(Merck, Darmstadt)
	17,8 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	(Merck, Darmstadt)
	2,7 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	(Merck, Darmstadt)
	1000 ml	<i>Aqua dest.</i>	
10x TBE:	108 g	Trizma base	(Sigma, Taufkirchen)
	55 g	Borsäure	(AppliChem, Gatersleben)
	8,3 g	EDTA	(Sigma, Taufkirchen)
	1000 ml	<i>Aqua dest.</i>	
10% NGS:	10%	<i>Normal Goat Serum</i> , gereinigtes	
		Ziegenserum	(Invitrogen, Karlsruhe)
	3%	Bovines Serumalbumin	(PAA, Pasching)
	0,3%	Triton X-100	(Sigma, Taufkirchen)
		PBS	
2% NGS:	2%	<i>Normal Goat Serum</i> , gereinigtes	
		Ziegenserum	(Invitrogen, Karlsruhe)
	3%	Bovines Serumalbumin	(PAA, Pasching)
	0,3%	Triton X-100	(Sigma, Taufkirchen)
		PBS	
Mowiol:	50 g	Mowiol	(Calbiochem, Nottingham)
	100 ml	Glycerol	(Roth, Karlsruhe)
	200 ml	PBS	
	1 Spatelspitze	n-Propyl-Gallate	(Sigma, Taufkirchen)

PFA 4%:	40 g	PFA	(Honeywell, Seelze)
	1000 ml	PBS	
		NaOH (pH 7,4)	(Merck, Darmstadt)
DAPI:	1 mg	DAPI	(Sigma, Taufkirchen)
	500 ml	PBS	
Lovastatin:	25 mg	Lovastatin	(Calbiochem, Nottingham)
	1 ml	Ethanol	(Merck, Darmstadt)
	0,813 ml	NaOH	(Merck, Darmstadt)
		HCl (pH 7,2)	(Merck, Darmstadt)
Simvastatin:	50 mg	Simvastatin	(Calbiochem, Nottingham)
	1 ml	Ethanol	(Merck, Darmstadt)
	0,813 ml	NaOH	(Merck, Darmstadt)
		HCl (pH 7,2)	(Merck, Darmstadt)
Vehikel:	1 ml	Ethanol	(Merck, Darmstadt)
	0,813 ml	NaOH	(Merck, Darmstadt)
		HCl (pH 7,2)	(Merck, Darmstadt)

## Geräte

Fluoreszenz-Mikroskop Axioplan 2	(Zeiss, Jena)
Stereomikroskop Stemi SV6	(Zeiss, Jena)
Operationsmikroskop M651	(Leica, Wetzlar)
Kryostat CM3050 S	(Leica, Wetzlar)
OT-Heizplatte SM30	(Grant, Cambridgeshire)
Wärmeschrank	(Memmert, Schwabach)
Homogenisator D-1	(Art-Miccra, Müllheim)
Zentrifuge 5415R	(Eppendorf, Hamburg)
NanoDrop 1000	(Peqlab, Erlangen)
T3 Thermocycler	(Biometra, Göttingen)
Sub-Cell GT Cell	(Bio-Rad, München)
Powerpac 1000	(Bio-Rad, München)

Gel-Dokumentation: - Darkbox	(Intas, Göttingen)
- CCD-Kamera	
- Software	
Vortexer Minishaker MS1	(IKA, Staufen)
Magnetrührer RCT basic	(IKA, Staufen)
Mikrowelle	(Bosch, Gerlingen)

### **Software**

Axiovision 4.6.3.0	(Zeiss, Jena)
AIDA 3.52.046	(Raytest, Straubenhardt)
SPSS 15.0	(SPSS, Chicago)

### **Axotomie**

Operationsinstrumente	(FST, Heidelberg)
Chloralhydrat	(Sigma, Taufkirchen)
Floxal Augentropfen	(Bausch&Lomb, Berlin)
Conjuncain EDO Augentropfen	(Bausch&Lomb, Berlin)

### **Immunhistochemie**

Paraformaldehyd	(Honeywell, Seelze)
Bim Antikörper #2819 Kaninchen	(Cell Signaling, Danvers)
TUJ1 (Class III $\beta$ -Tubulin) MMS-435P Maus	(Covance, Münster)
Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 Ziege anti-Maus	(Invitrogen, Karlsruhe)
Cy3 Ziege anti-Kaninchen	(Invitrogen, Karlsruhe)
4',6-Diamidino-2-Phenylindole Hydrochloride	(Sigma, Taufkirchen)
Tissue-Tek <sup>®</sup> O.C.T Compound	(Sakura, Zoeterwoude)
Objektträger Superfrost Plus 76x26mm	(Menzel, Braunschweig)
Deckgläser 24x24mm, 24x50mm	(Menzel, Braunschweig)
Glycerol	(Roth, Karlsruhe)
Mowiol	(Calbiochem, Nottingham)



**RT-PCR**

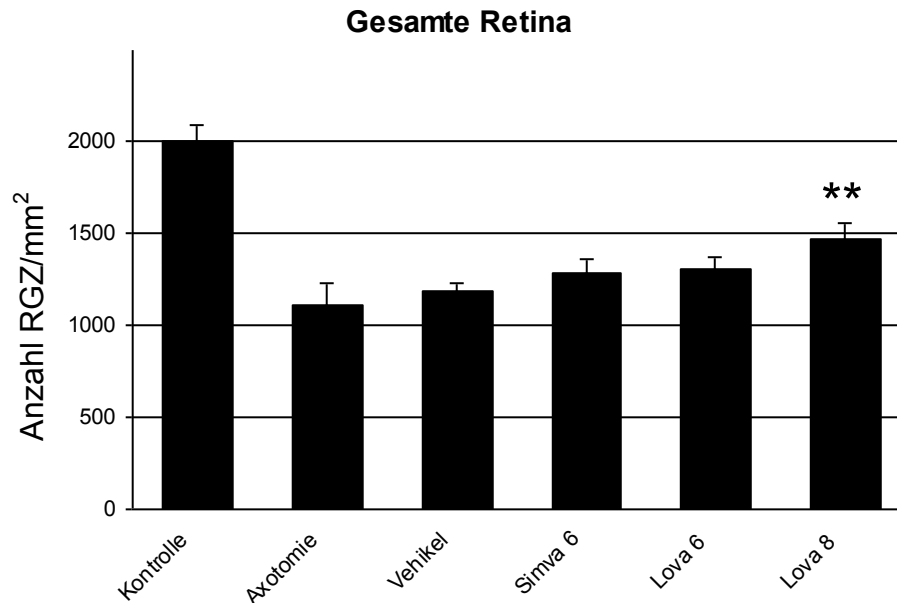
2-Mercaptoethanol	(Sigma, Taufkirchen)
RNeasy Micro Kit 50	(Qiagen, Hilden)
-RTL-Puffer	
-RW1-Puffer	
-RPE-Puffer	
-Trennsäulen	
-RNase freies Wasser	
Rnase-free DNase Set	(Qiagen, Hilden)
-DNase I	
-RDD-Puffer	
iScript cDNA Synthesis Kit	(Bio-Rad, München)
MasterMix (2.5x)	(Eppendorf, Hamburg)
Bim s	5'-GCC CCT ACC TCC CTA CAG AC-3' (MWG, Ebersberg)
Bim as	5'-CAG GTT CCT CCT GAG ACT GC-3' (MWG, Ebersberg)
GAPDH s	5'-TCC CTC AAG ATT GTC AGC AA-3' (Biomers.net, Ulm)
GAPDH as	5'-AGA TCC ACA ACG GAT ACA TT-3' (Biomers.net, Ulm)
Parafilm	(Pechiney Plastic Packaging, Chicago)
6x Loading Dye Solution	(Fermentas, St. Leon-Rot)
GeneRuler DNA Ladder Mix 0.1 µg/µl	(Fermentas, St. Leon-Rot)
Agarose	(Invitrogen, Karlsruhe)
Ethidiumbromid	(Sigma, Taufkirchen)

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Lovastatin wirkt dosisabhängig neuroprotektiv auf axotomierte retinale Ganglienzellen *in vivo*

Es wurde die antiapoptotische Wirkung der systemisch applizierten HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren Lovastatin und Simvastatin dosisabhängig auf retinale Ganglienzellen *in vivo* untersucht.

Unbehandelte Kontrolltiere hatten eine mittlere Ganglienzelldichte von  $2003,79 \pm 86,32$  pro  $\text{mm}^2$ , wobei die Anzahl in der mittleren Retina um 25% höher war als in der äußeren (peripheren) Retina (Diagramm 1, Tabelle 7). Dieses Verhältnis zeigte sich in etwa auch bei den anderen Gruppen. 7 Tage nach Axotomie des optischen Nerven fiel die Anzahl retinaler Ganglienzellen um 44,7% auf  $1108,10 \pm 125,82$ . Die mit Vehikel behandelten Tiere zeigten mit  $1185,43 \pm 47,78$  ein ähnliches Ergebnis wie die unbehandelten ( $p > 0,05$ ). Eine Therapie mit Simvastatin (6 mg/kg) oder Lovastatin (6 mg/kg) über 7 Tage zeigte tendenziell einen Anstieg in der Anzahl überlebender RGZ im Gegensatz zur Vehikelgruppe mit jeweils 9% ( $1278,98 \pm 83,46$ ) beziehungsweise 10% ( $1301,39 \pm 72,14$ ), jedoch ohne signifikanten Unterschied ( $p > 0,05$ ) (Tabelle 8). Zwischen Simvastatin und Lovastatin bestand für eine Dosierung von 6 mg/kg kein signifikanter Unterschied ( $p > 0,05$ ). Durch eine Behandlung mit 8 mg/kg Lovastatin stieg die Anzahl der Ganglienzellen auf  $1464,34 \pm 91,43$  pro  $\text{mm}^2$ . Das entspricht einem signifikanten Anstieg von 19% gegenüber den mit Vehikel behandelten Tieren ( $p < 0,01$ ). In der zentralen Retina ist der Anstieg mit 15% nicht signifikant ( $p > 0,05$ ) (Diagramm 2, Tabelle 9, 10), im äußeren Areal zeigte sich mit 32% eine signifikante Zunahme der überlebenden Ganglienzellen ( $p < 0,01$ ) (Diagramm 3, Tabelle 11, 12). Beispiele für die Unterschiede zwischen den Gruppen sind in Abbildung 11 a) - c) gezeigt.



**Diagramm 1:** Das Balkendiagramm zeigt die durchschnittlichen Werte der RGZ/mm<sup>2</sup> in den einzelnen Gruppen über der gesamten Retina. Die Fehlerbalken zeigen die einfache Standardabweichung an. Lediglich die Behandlung mit Lovastatin in einer Dosis von 8 mg/kg führte zu einer signifikanten Zunahme überlebender RGZ im Vergleich zu Kontrollen und Vehikelbehandlung (\*\*,  $p \leq 0,01$ ). Simva 6 = Simvastatin 6 mg/kg, Lova 6 = Lovastatin 6 mg/kg, Lova 8 = Lovastatin 8 mg/kg.

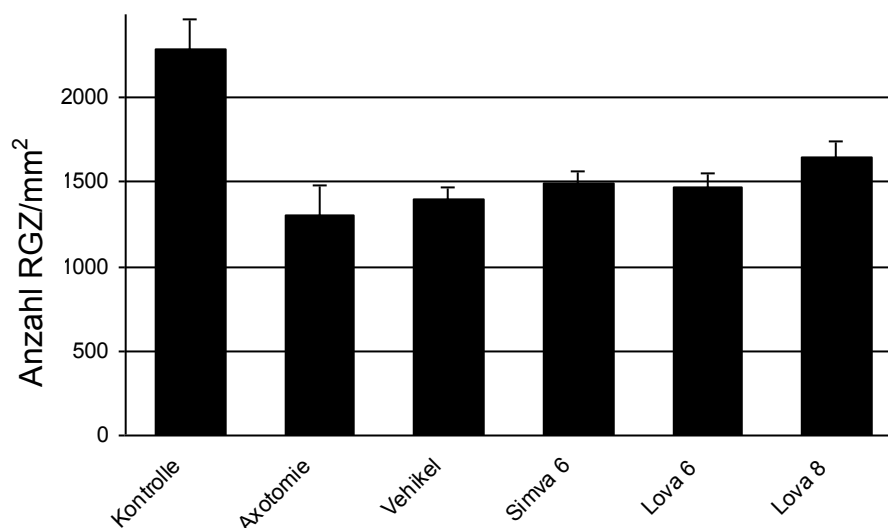
Versuchsgruppen	Anzahl RGZ/mm <sup>2</sup>	$\pm$	$\sigma$
Kontrolle n=5	2003,79	$\pm$	86,32
Axotomie n=7	1108,10	$\pm$	125,82
Axo + Vehikel n=4	1185,43	$\pm$	47,78
Axo + Simvastatin 6 mg/kg n=4	1278,98	$\pm$	83,46
Axo + Lovastatin 6 mg/kg n=4	1301,39	$\pm$	72,14
Axo + Lovastatin 8 mg/kg n=6	1464,34	$\pm$	91,43

**Tabelle 7:** Es sind die für Diagramm 1 verwendeten Werte angegeben und die Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe aufgeführt.

	Kontrolle	Axotomie	Vehikel	Simva 6	Lova 6	Lova 8
Kontrolle		$p \leq 0,001$	$p \leq 0,001$	$p \leq 0,001$	$p \leq 0,001$	$p \leq 0,001$
Axotomie	$p \leq 0,001$		n.s.	n.s.	$p \leq 0,05$	$p \leq 0,001$
Vehikel	$p \leq 0,001$	n.s.		n.s.	n.s.	$p \leq 0,01$
Simva 6	$p \leq 0,001$	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.
Lova 6	$p \leq 0,001$	$p \leq 0,05$	n.s.	n.s.		n.s.
Lova 8	$p \leq 0,001$	$p \leq 0,001$	$p \leq 0,01$	n.s.	n.s.	

**Tabelle 8:** Es sind die Signifikanzen der Einzelvergleiche zwischen den Gruppen über der gesamten Retina aufgeführt. n.s. = nicht signifikant ( $p > 0,05$ ), Simva 6 = Simvastatin 6 mg/kg, Lova 6 = Lovastatin 6 mg/kg, Lova 8 = Lovastatin 8 mg/kg.

## Mittelere Retina



**Diagramm 2:** Das Balkendiagramm zeigt die durchschnittlichen Werte der RGZ/mm<sup>2</sup> in den einzelnen Gruppen über der mittleren Retina. Die Fehlerbalken zeigen die einfache Standardabweichung an. Keine der behandelten Gruppen ist gegenüber der Vehikel-Gruppe signifikant erhöht ( $p > 0,05$ ). Simva 6 = Simvastatin 6 mg/kg, Lova 6 = Lovastatin 6 mg/kg, Lova 8 = Lovastatin 8 mg/kg.

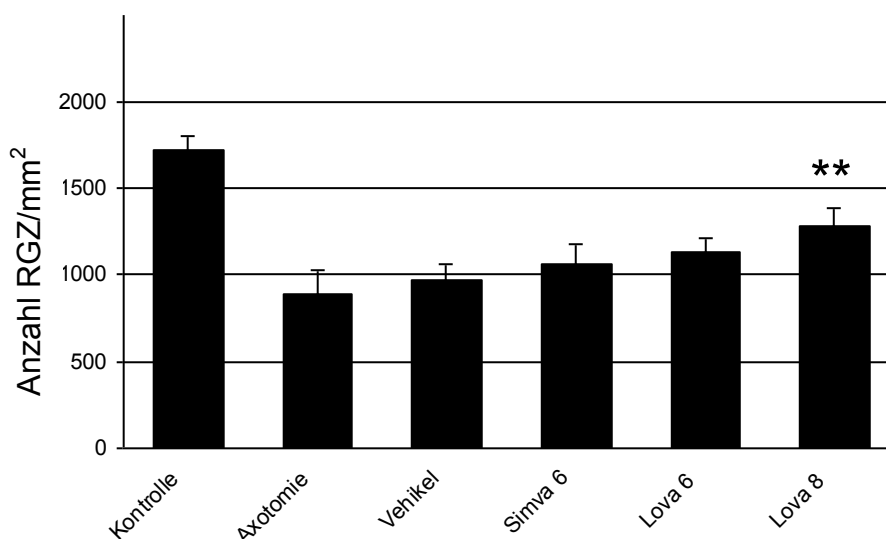
Versuchsgruppen	Anzahl RGZ/mm <sup>2</sup>	±	σ
Kontrolle n=5	2285,06	±	182,04
Axotomie n=7	1309,48	±	169,88
Axo + Vehikel n=4	1401,54	±	63,61
Axo + Simvastatin 6 mg/kg n=4	1495,89	±	72,29
Axo + Lovastatin 6 mg/kg n=4	1471,10	±	87,16
Axo + Lovastatin 8 mg/kg n=6	1648,58	±	95,40

**Tabelle 9:** Es sind die für Diagramm 2 verwendeten Werte angegeben und die Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe aufgeführt.

	Kontrolle	Axotomie	Vehikel	Simva 6	Lova 6	Lova 8
Kontrolle		$p \leq 0,001$	$p \leq 0,001$	$p \leq 0,001$	$p \leq 0,001$	$p \leq 0,001$
Axotomie	$p \leq 0,001$		n.s.	n.s.	n.s.	$p \leq 0,01$
Vehikel	$p \leq 0,001$	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.
Simva 6	$p \leq 0,001$	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.
Lova 6	$p \leq 0,001$	n.s.	n.s.	n.s.		n.s.
Lova 8	$p \leq 0,001$	$p \leq 0,01$	n.s.	n.s.	n.s.	

**Tabelle 10:** Es sind die Signifikanzen der Einzelvergleiche zwischen den Gruppen über der mittleren Retina aufgeführt. n.s. = nicht signifikant ( $p > 0,05$ ), Simva 6 = Simvastatin 6 mg/kg, Lova 6 = Lovastatin 6 mg/kg, Lova 8 = Lovastatin 8 mg/kg.

## Äußere Retina



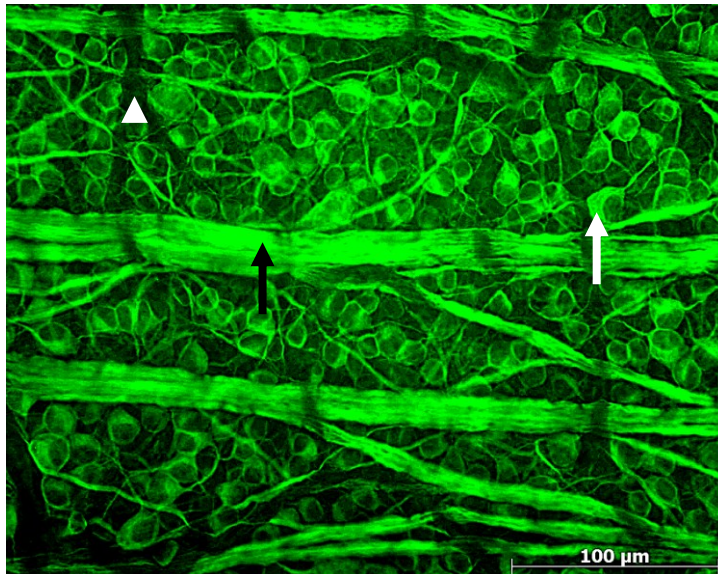
**Diagramm 3:** Das Balkendiagramm zeigt die durchschnittlichen Werte der RGZ/mm<sup>2</sup> in den einzelnen Gruppen über der äußeren Retina. Die Fehlerbalken zeigen die einfache Standardabweichung an. Lediglich die Behandlung mit Lovastatin in einer Dosis von 8 mg/kg führte zu einer signifikanten Zunahme überlebender RGZ im Vergleich zu Kontrollen und Vehikelbehandlung (\*\*,  $p \leq 0,01$ ). Simva 6 = Simvastatin 6 mg/kg, Lova 6 = Lovastatin 6 mg/kg, Lova 8 = Lovastatin 8 mg/kg.

Versuchsgruppen	Anzahl RGZ/mm <sup>2</sup>	±	σ
Kontrolle n=5	1722,53	±	70,62
Axotomie n=7	888,28	±	139,59
Axo + Vehikel n=4	969,32	±	89,16
Axo + Simvastatin 6 mg/kg n=4	1062,08	±	111,55
Axo + Lovastatin 6 mg/kg n=4	1131,69	±	77,97
Axo + Lovastatin 8 mg/kg n=6	1280,10	±	107,00

**Tabelle 11:** Es sind die für Diagramm 3 verwendeten Werte angegeben und die Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe aufgeführt.

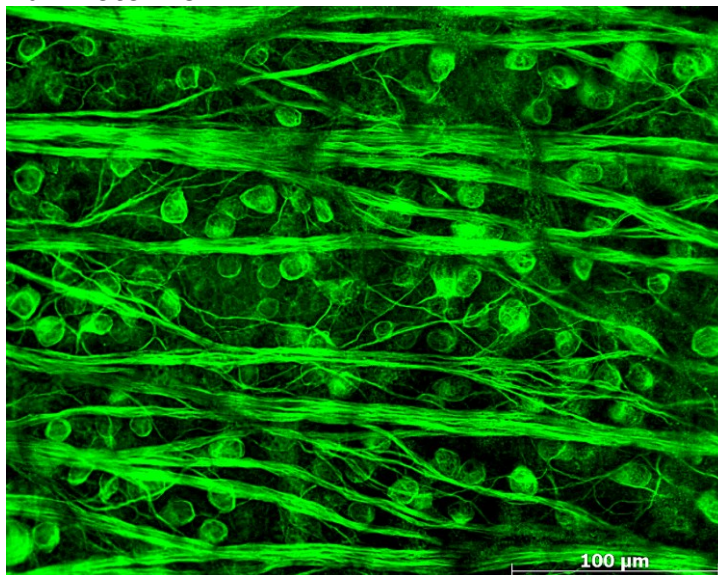
	Kontrolle	Axotomie	Vehikel	Simva 6	Lova 6	Lova 8
Kontrolle		$p \leq 0,001$	$p \leq 0,001$	$p \leq 0,001$	$p \leq 0,001$	$p \leq 0,001$
Axotomie	$p \leq 0,001$		n.s.	n.s.	$p \leq 0,01$	$p \leq 0,001$
Vehikel	$p \leq 0,001$	n.s.		n.s.	n.s.	$p \leq 0,01$
Simva 6	$p \leq 0,001$	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.
Lova 6	$p \leq 0,001$	$p \leq 0,01$	n.s.	n.s.		n.s.
Lova 8	$p \leq 0,001$	$p \leq 0,001$	$p \leq 0,01$	n.s.	n.s.	

**Tabelle 12:** Es sind die Signifikanzen der Einzelvergleiche zwischen den Gruppen über der äußeren Retina aufgeführt. n.s. = nicht signifikant ( $p > 0,05$ ), Simva 6 = Simvastatin 6 mg/kg, Lova 6 = Lovastatin 6 mg/kg, Lova 8 = Lovastatin 8 mg/kg.

**Kontrolle**

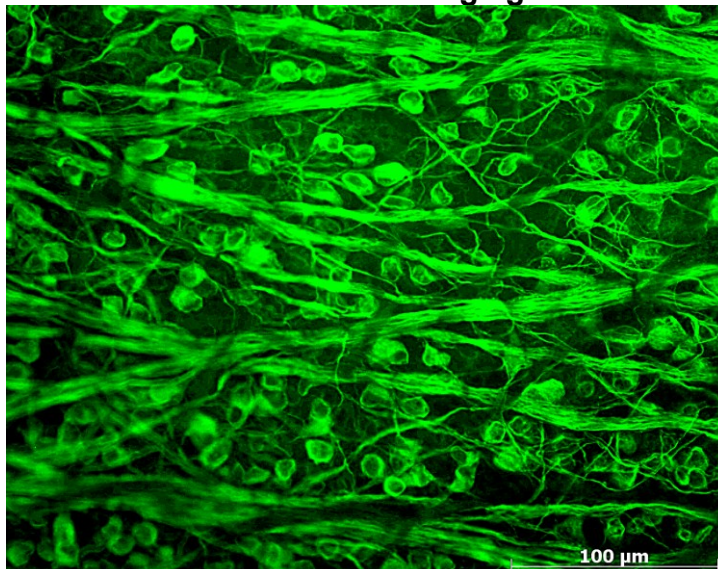
**Abbildung 11 a):**  
Repräsentatives Zählfeld eines mittleren Retina-Areals einer Kontrolle ohne Axotomie. Es sind RGZ mit ausgespartem Kern und abgehendem Axon zu sehen (weißer Pfeil). Zusätzlich sind auch angefärbte Nervenfaserbündel (schwarzer Pfeil) und Gefäßschatten (weiße Pfeilspitze) zu erkennen.

Anti- $\beta$ III-Tubulin /  
Alexa 488,  
Vergrößerung 400x.

**7d Axotomie**

**Abbildung 11 b):**  
Repräsentatives Zählfeld eines mittleren Retina-Areals einer axotomierten Retina ohne Behandlung nach 7 Tagen. Es ist eine deutliche Abnahme der Anzahl markierter RGZ zu erkennen.

Anti- $\beta$ III-Tubulin /  
Alexa 488,  
Vergrößerung 400x.

**7d Axotomie + Lovastatin 8 mg/kg**

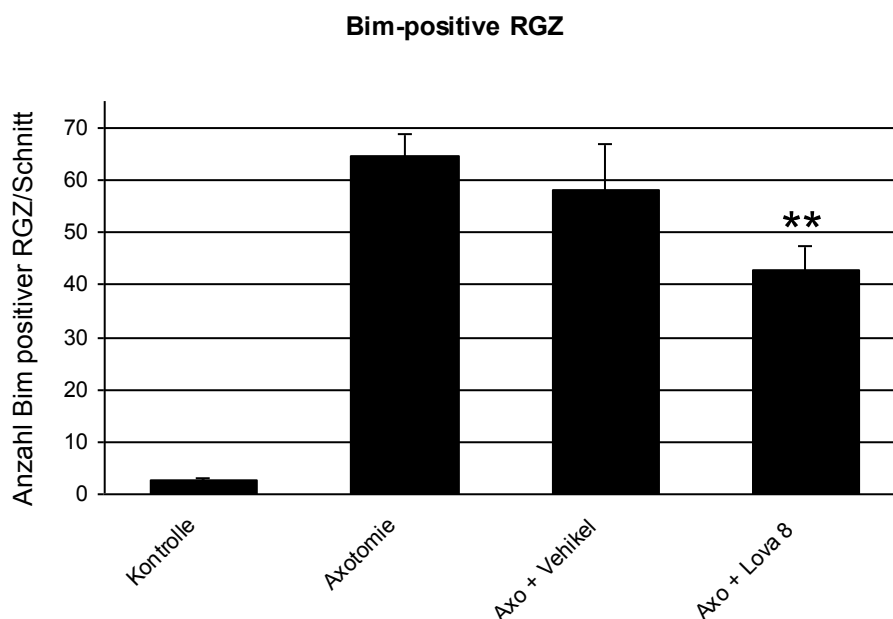
**Abbildung 11 c):**  
Repräsentatives Zählfeld eines mittleren Retina-Areals eines axotomierten Auges nach 7 Tagen Behandlung mit Lovastatin (8 mg/kg). Die RGZ-Anzahl ist im Vergleich zu den unbehandelten Tieren erkennbar erhöht.

Anti- $\beta$ III-Tubulin /  
Alexa 488,  
Vergrößerung 400x.

## **5.2 Die Anzahl Bim-positiver Ganglienzellen nimmt unter Lovastatin-Behandlung ab**

Es wurde der Einfluss einer Axotomie des optischen Nerven auf Bim in retinalen Ganglienzellen nach 4 Tagen immunhistochemisch untersucht und mit einer Behandlung von 8 mg/kg Lovastatin verglichen. Es zeigten sich in der unbehandelten Kontrollgruppe nur einzelne sichtbar mit Bim-Antikörper gefärbte RGZ ( $2,56 \pm 0,49$  RGZ / Schnitt) (Diagramm 1, Abbildung 12 a). 4 Tage nach Axotomie ohne Behandlung stieg die Anzahl deutlich auf durchschnittlich  $64,56 \pm 4,45$  RGZ / Schnitt (Tabelle 13), wobei diese häufig kräftiger markiert waren (Abbildung 12 b). Die mit Vehikel behandelten Tiere zeigten tendenziell etwas weniger Bim-positive Zellen, dieser Trend war allerdings nicht signifikant ( $58,26 \pm 8,64$ ) (Tabelle 14). Eine Behandlung mit Lovastatin zeigte einen signifikanten Abfall Bim positiver RGZ ( $42,71 \pm 4,60$ ). Auch nahm die Intensität der Markierung im Vergleich zu den unbehandelten Tieren ab (Abbildung 12 c).

Des Weiteren ergab sich eine gute Übereinstimmung von Anti-Bim, Anti- $\beta$ 3-Tubulin und DAPI gefärbten retinalen Ganglienzellen (Abbildung 13). Entsprechend der RGZ-Verteilung in der Retina fand sich eine Zunahme der Dichte von Bim-positiven Zellen vom Rand der Retina Richtung Discus nervi optici.



**Diagramm 4:** Das Balkendiagramm zeigt die durchschnittliche Anzahl Bim-positiver RGZ pro Gefrierschnitt für die jeweilige Versuchsgruppe. Die Fehlerbalken zeigen die einfache Standardabweichung an. Lediglich die Behandlung mit Lovastatin in einer Dosis von 8 mg/kg führte zu einer signifikanten Abnahme Bim-positiver RGZ im Vergleich zu Kontrollen und Vehikelbehandlung (\*\*,  $p \leq 0,01$ ). Axo = Axotomie, Lova 8 = Lovastatin 8 mg/kg.

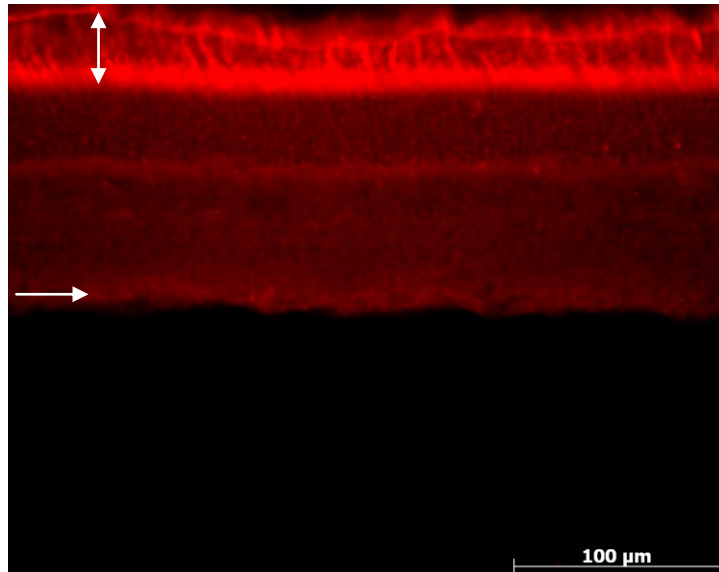
Versuchsgruppen	Anzahl Bim-positiver RGZ	$\pm$	$\sigma$
Kontrolle n=3	2,56	$\pm$	0,49
Axotomie n=4	64,56	$\pm$	4,45
Axo + Vehikel n=4	58,26	$\pm$	8,64
Axo + Lovastatin 8 mg/kg n=5	42,71	$\pm$	4,60

**Tabelle 13:** Es sind die für Diagramm 4 verwendeten Werte angegeben und die Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe aufgeführt.

	Kontrolle	Axotomie	Vehikel	Lova 8
Kontrolle		$p \leq 0,001$	$p \leq 0,001$	$p \leq 0,001$
Axotomie	$p \leq 0,001$		n.s.	$p \leq 0,001$
Vehikel	$p \leq 0,001$	n.s.		$p \leq 0,01$
Lova 8	$p \leq 0,001$	$p \leq 0,001$	$p \leq 0,01$	

**Tabelle 14:** Es sind die Signifikanzen der Einzelvergleiche zwischen den Gruppen aufgeführt. n.s. = nicht signifikant ( $p > 0,05$ ), Lova 8 = Lovastatin 8 mg/kg.

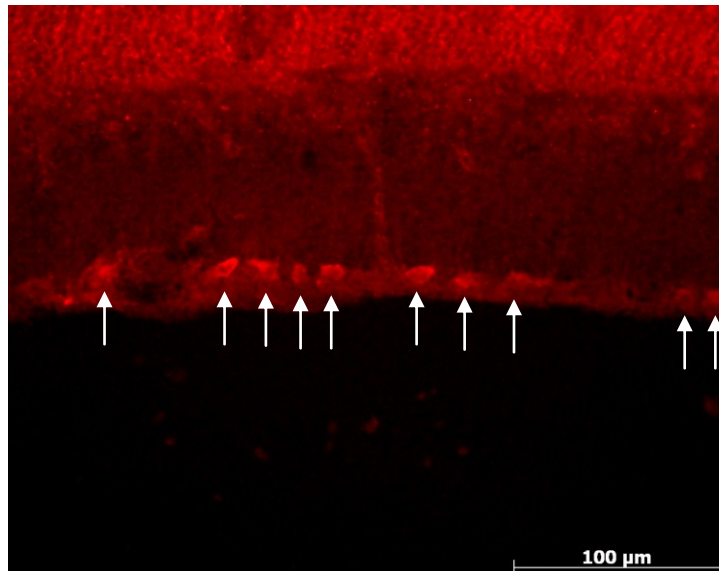


**Kontrolle****Abbildung 12 a):**

Repräsentativer Ausschnitt einer Kontroll-Retina ohne Axotomie.

Es sind keine Bim-positiven RGZ in der RGZ-Schicht zu erkennen (Pfeil). Am oberen Bildrand erscheinen die gefärbten Außensegmente der Photorezeptorzellen (Doppelpfeil).

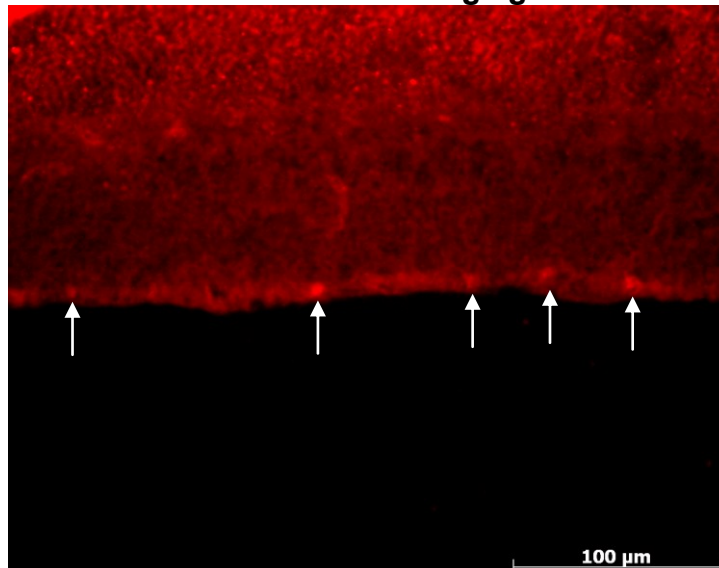
Bim Antikörper / Cy3, Vergrößerung 400x.

**4d Axotomie****Abbildung 12 b):**

Repräsentativer Ausschnitt eines Gefrierschnittes nach 4d Axotomie.

Mehrere Bim-positive RGZ sind mit weißen Pfeilen markiert. Der Zellkern bleibt ausgespart.

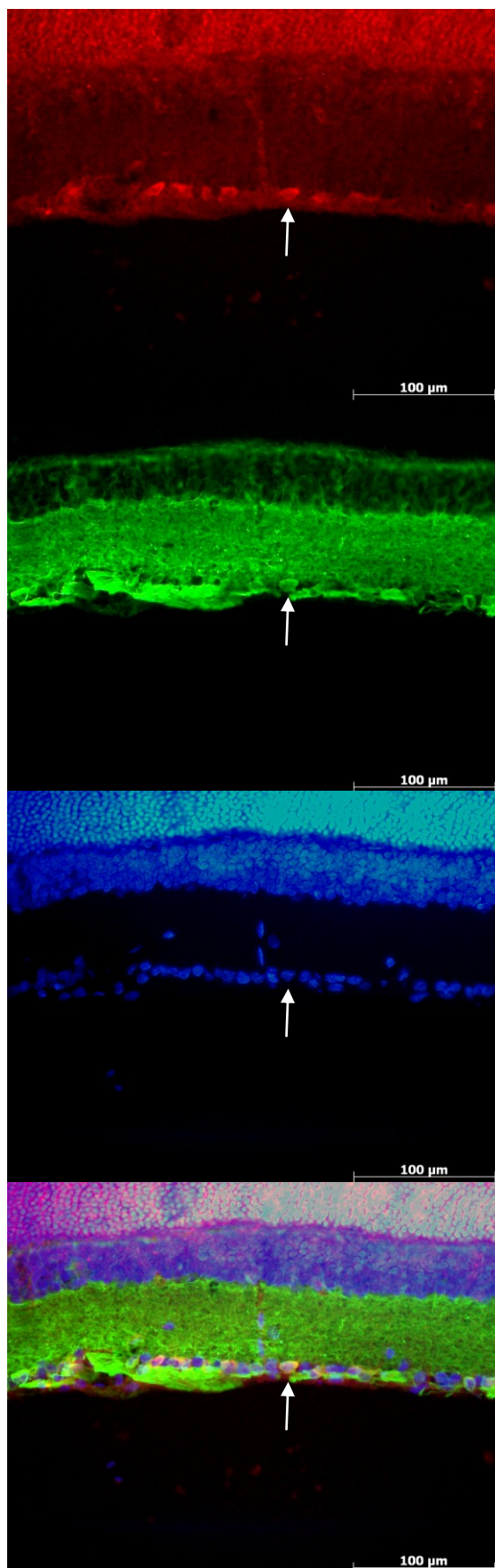
Bim Antikörper / Cy3, Vergrößerung 400x.

**4d Axotomie + Lovastatin 8 mg/kg****Abbildung 12 c):**

Repräsentativer Ausschnitt eines Gefrierschnittes nach 4d Axotomie + Lovastatin 8 mg/kg.

Im Vergleich zu den unbehandelten Tieren sind weniger Bim positive RGZ zu erkennen (Pfeile).

Bim Antikörper / Cy3, Vergrößerung 400x.



**Abbildung 13:** Ko-Lokalisation von Bim und  $\beta$ III-Tubulin mit DAPI-Kernmarkierung in retinalen Ganglienzellen. Ausschnitt eines Retinagefrierschnittes eines Tieres nach Axotomie, ohne Behandlung. Pfeil zeigt auf eine RGZ, Vergrößerung 400x.

a) Bim Antikörper / Cy3

b) Anti- $\beta$ 3-Tubulin / Alexa488

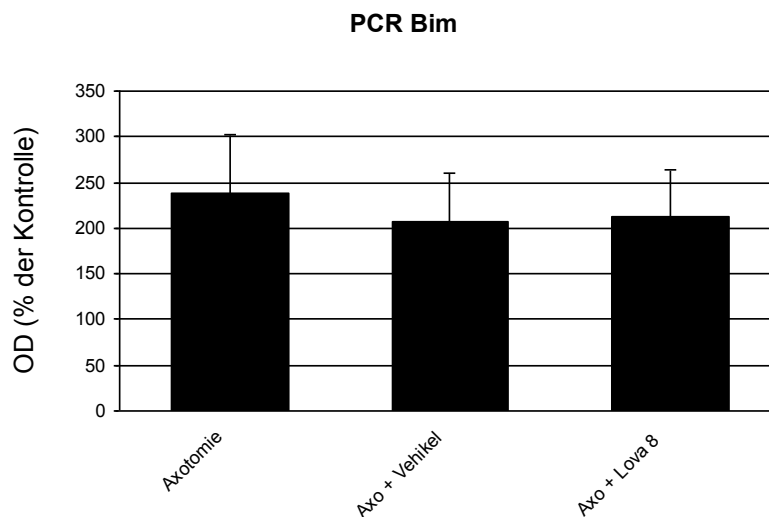
c) DAPI

d) Ko-Lokalisation der drei Signale

### 5.3 Lovastatin-Behandlung zeigt keinen Einfluss auf die Bim-Expression in der Gesamt-Retina

Es wurde mittels RT-PCR die *bim*-Expression in der gesamten Retina 4 Tage nach Axotomie und nach Lovastatin-Behandlung von 8 mg/kg untersucht.

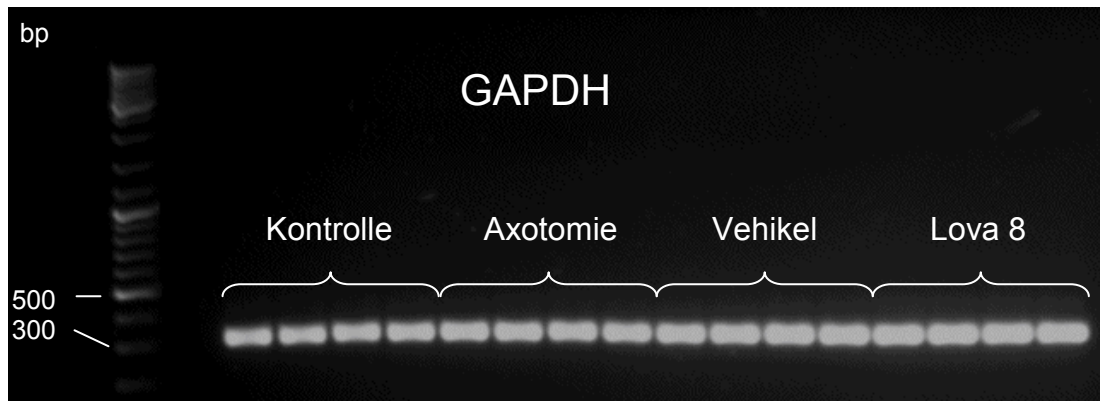
Es fand sich nach Axotomie im Vergleich zur Kontrollgruppe ein Anstieg der retinalen *bim*-Expression um  $239\% \pm 63\%$ , nach Vehikel-Behandlung um  $208\% \pm 52\%$  und nach Lovastatin-Behandlung um  $213 \pm 51\%$  (Diagramm 5). Dieser Anstieg ist nur in der Axotomie- und Lovastatingruppe signifikant ( $p < 0,05$ ), zwischen den behandelten Gruppen gibt es keine signifikanten Unterschiede ( $p > 0,05$ ) (Tabelle 15). Trotz guter Homogenität der Proben in der Testung mit GAPDH (Abbildung 14a), ist die Streuung zwischen den einzelnen Tieren relativ groß (Abbildung 14b).



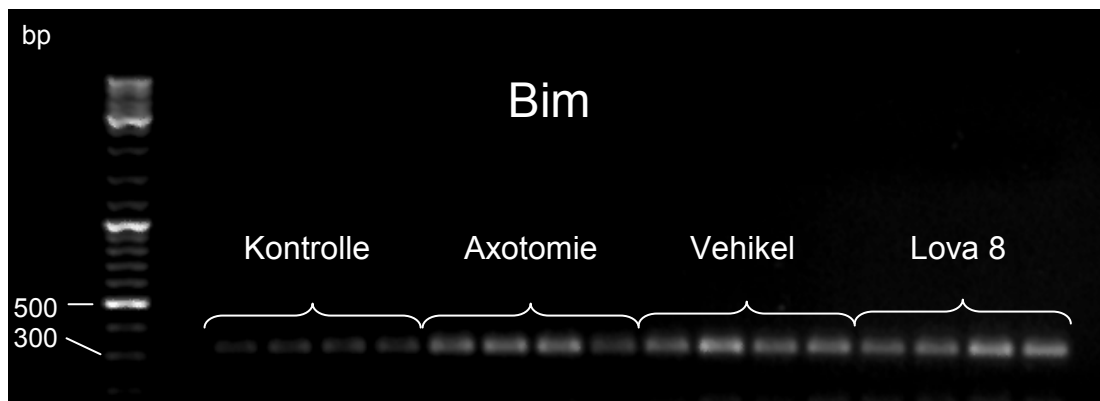
**Diagramm 5:** Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte der optischen Dichten (OD) der einzelnen Banden der RT-PCR-Produkte relativ zur Kontrolle. Zwischen den axotomierten Gruppen gibt es keine signifikanten Unterschiede ( $p > 0,05$ ). Die Fehlerbalken zeigen die einfache Standardabweichung an. Axo = Axotomie, Lova 8 = Lovastatin 8 mg/kg.

	Kontrolle	Axotomie	Vehikel	Lova 8
Kontrolle		$p \leq 0,05$	n.s.	$p \leq 0,05$
Axotomie	$p \leq 0,05$		n.s.	n.s.
Vehikel	n.s.	n.s.		n.s.
Lova 8	$p \leq 0,05$	n.s.	n.s.	

**Tabelle 15:** Es sind die Signifikanzen der Einzelvergleiche zwischen den Gruppen aufgeführt. n.s. = nicht signifikant ( $p > 0,05$ ), Lova 8 = Lovastatin 8 mg/kg.



**Abbildung 14 a):** Aufnahme eines Gels mit dem RT-PCR-Produkt des *Housekeeping*-Gens GAPDH zur Überprüfung der Probenhomogenität. Aufgetragen wurden jeweils 4 unabhängige Proben von Retinae einzelner Tiere aus den angegebenen Versuchsgruppen. Lova 8 = Lovastatin 8 mg/kg, bp = Basenpaare.



**Abbildung 14 b):** Aufnahme eines Gels mit dem RT-PCR-Produkt von Bim bei 319 bp. Aufgetragen wurden jeweils 4 unabhängige Proben von Retinae einzelner Tiere aus den angegebenen Versuchsgruppen. Während die Kontrollgruppe homogen erscheint, gibt es zwischen den Versuchstieren in den axotomierten Gruppen erkennbare Unterschiede, ohne dass sich signifikante Unterschiede in den Mittelwerten ergeben ( $p > 0,05$ ). Lova 8 = Lovastatin 8 mg/kg, bp = Basenpaare.

## 6. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die neuroprotektive Potenz der klinisch eingesetzten Statine Simvastatin und Lovastatin auf retinale Ganglienzellen nach Durchtrennung des optischen Nervs der Ratte *in vivo* zu untersuchen. Weiterhin sollte der Einfluß der Statingabe auf die Expression des Apoptose-induzierenden Proteins Bim untersucht werden. Die Arbeitshypothese lautet, dass Statine nach systemischer Gabe einen neuroprotektiven Effekt auf axotomierte retinale Ganglienzellen haben.

### 6.1 Lovastatin wirkt neuroprotektiv auf axotomierte retinale Ganglienzellen

Die Tatsache, dass nach Axotomie des optischen Nervs ein Großteil der RGZ in reproduzierbarer Anzahl einem apoptotischen Zelltod unterliegt, ist schon länger bekannt (Garcia-Valenzuela et al. 1994, Quigley et al. 1995). Dabei sind vor allem die selektive Durchtrennung von RGZ-Axonon ohne Schädigung anderer retinaler Strukturen, sowie die intakte Durchblutung der Retina dafür entscheidend, dass die Apoptose nur RGZ betrifft und keine bedeutsame Nekrose entsteht.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die ursprüngliche Anzahl von 2004 RGZ/mm<sup>2</sup> beim unbehandelten Auge 7 Tage nach Axotomie um 45% auf 1108 RGZ/mm<sup>2</sup> fällt. Der Unterschied im äußeren Retinaareal fiel mit 48% etwas deutlicher als im mittleren Areal mit 43% aus. Die absolute RGZ-Anzahl und die relative Abnahme durch Apoptose decken sich sehr gut mit vergleichbaren Arbeiten (Berkelaar et al. 1994, Kretz et al. 2006).

Nach systemischer Therapie mit Statinen durch tägliche subkutane Applikation in der Inguinalregion zeigte sich dosisabhängig ein antiapoptotischer Effekt auf RGZ. Dieser war für 4 mg/kg Körpergewicht bei Simvastatin und Lovastatin mit 9% bzw. 10% mehr überlebenden RGZ bezogen auf mit Vehikel behandelten Tieren ähnlich hoch und nicht signifikant. Für 8 mg/kg Lovastatin erhöhte sich der Effekt signifikant auf 19% gerettete RGZ. Höhere Dosierungen wurden nicht getestet, da in dieser Arbeit versucht wurde, eine möglichst große Nähe zu klinischen Dosierungen beizubehalten. Eine aktuelle Phase I Studie gibt die kurzfristig von Menschen

tolerierte Dosis von Lovastatin für die Akuttherapie mit 8 mg/kg an (Elkind et al. 2009). Bei einer anderen Untersuchung der eigenen Arbeitsgruppe konnte 10 Tage nach retinaler Ischämie und einer fünftägigen systemischen Behandlung mit 4 mg/kg Lovastatin eine Rettung von 18% RGZ erzielt werden, wobei Pravastatin mit 36% deutlich besser abschnitt (Schmeer et al. 2008). Bei eigenen Vorversuchen konnte jedoch keine Wirkung durch Pravastatin erzielt werden. Die Diskrepanzen der Ergebnisse sind eventuell durch die Verwendung von unterschiedlichen Läsionsmodellen zu erklären, da beim Ischämiemodell die Blut-Hirn-Schranke (BHS) gestört wird. In einem weiteren Versuch der Arbeitsgruppe wurden 30 µM Simvastatin täglich über drei Tage intravitreal appliziert und die Ganglienzellzahl nach 7 Tagen ausgewertet. Hier lag das Überleben der Simvastatingruppe signifikant um 43% höher als bei den unbehandelten Tieren, was mit der höheren lokalen Konzentration von Simvastatin im Auge zusammenhängen könnte (Kretz et al. 2006). Jedoch ist dieser Ansatz durch die deutlich höhere Infektionsgefahr nicht unproblematisch und die Ergebnisse können durch eine Reizung der Linse und einer damit verbundenen Neuroprotektion durch Anstieg neurotropher Faktoren beeinflusst werden (Fischer et al. 2000).

Es bleibt weiter zu klären, worauf der neuroprotektive Effekt von Statinen beruht. Möglich ist unter anderem eine direkte Wirkung auf individuelle Neurone wie auch indirekte Wirkungen über die Beeinflussung des Milieus. In Zellkulturen konnte gezeigt werden, dass Atorvastatin die Vermehrung von neuronalen Vorläuferzellen fördert (Chen et al. 2008), dass Atorvastatin und Simvastatin den oxidativen Stress durch HIV-1 und Ethanol mildern (Acheampong et al. 2007), dass Lovastatin den Kainat-induzierten Untergang hippokampaler Neurone reduziert (He et al. 2006) und dass Statine Exzitotoxizität durch NMDA-induzierten Ca-Influx hemmen (Bösel et al. 2005, Zacco et al. 2003). Oxidativer Stress und Exzitotoxizität treten auch nach Läsion des optischen Nervs bei RGZ auf (Lieven et al. 2006, Vorwerk et al. 2004). Dies kann auf einen direkten Einfluss durch Statine hindeuten. Für eine direkte Wirkung müssen die Statine jedoch *in vivo* bis an die RGZ gelangen. Es wurde bereits nachgewiesen, dass die BHS bei Axotomie des optischen Nervs intakt bleibt (Hou et al. 2004), weshalb diese von den Statinen überwunden werden muss. Dabei spielt die unterschiedliche

Lipophilie der Statine eine große Rolle. So wurde beim Vergleich verschiedener Statine eine unterschiedliche Permeabilität der BHS festgestellt (Lovastatin > Simvastatin > Pravastatin), wobei Pravastatin auf Grund seiner hydrophilen Eigenschaften die schlechteste Permeabilität vorweist (Saheki et al. 1994). Zusätzlich unterliegt Pravastatin wie Pitavastatin einem starken Efflux über multispezifische Organo-Anion-Transporter (OATP) (Kikuchi et al. 2004). Dennoch scheint eine Wirkung von Pravastatin auf die Gen-Expression von Neuronen bei intakter BHS möglich zu sein (Johnson-Anuna et al. 2005), ohne dass der Mechanismus bekannt wäre. Die mögliche direkte Wirkung von Statinen *in vivo* sollte daher in zukünftigen Forschungsarbeiten thematisiert und gegebenenfalls nachgewiesen werden.

Durch diverse pleiotrope Effekte der Statine lässt sich eine ganze Reihe von möglichen Ansatzpunkten für indirekte Wirkungen finden. Jedoch sind viele davon meist Ergebnis einer längerfristigen Einnahme und dadurch für die vorliegende wissenschaftliche Untersuchung von ungewisser Bedeutung. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass nach 7 Tagen oraler Simvastatin-Einnahme bei jungen gesunden Männern signifikant die Durchblutung der Retina zunimmt und zugleich der intraokuläre Druck (IOP) sinkt. Dieser hämodynamische Effekt wird am ehesten durch eine Vasodilatation kleiner Gefäße über eine NO-Steigerung verursacht, während die Senkung des IOP wahrscheinlich über Hemmung der Rho-Kinase vermittelt wird (Nagaoka et al. 2006). In einer Untersuchung unserer Arbeitsgruppe fand sich jedoch nach Ischämie-induzierter RGZ-Läsion und Simvastatingabe über 6 Tage eine leichte Erhöhung des IOP (Schmeer et al. 2008). Dieser Unterschied könnte durch die unterschiedlichen Spezies und durch die Läsion bedingt sein.

Auch entzündungshemmende Effekte von Statinen müssen in diesem Zusammenhang in Betracht gezogen werden. So wurde eine Woche nach Axotomie des ON eine Zunahme der Aktivität und Quantität von Mikroglia in der Retina gefunden (Garcia-Valenzuela et al. 2005). Auch wenn die Entzündung eine eher untergeordnete Rolle bei der Apoptose von RGZ durch Axotomie spielt, so könnten Statine dennoch auf diese Weise ebenfalls

antiapoptotisch wirken, wie für systemische Pitavastatingabe in einem retinalen NMDA-Modell *in vivo* gezeigt wurde (Nakazawa et al. 2007).

Nach Axotomie kommt es zu einer Zunahme der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) in der Retina, die mit für die Apoptose von RGZ verantwortlich ist (Koeberle und Ball 1999). Die nach Statinbehandlung beobachtete Reduktion der iNOS-Aktivität könnte ebenfalls zu einem neuroprotektiven Effekt beitragen (Lee et al. 2008). In einer Untersuchung der Arbeitsgruppe konnte auch eine Erhöhung der Heat Shock Protein 27 Expression nach Simvastatin-Behandlung gezeigt werden (Kretz et al. 2006), die für einen Teil der beobachteten Rettung von RGZ durch Lovastatin mit verantwortlich sein könnte.

Es wurde mehrfach gezeigt, dass oral aufgenommene Statine im Gegensatz zum Menschen bei Ratten und Mäusen kaum einen Effekt auf die Cholesterinsynthese zeigen, was durch einen effizienteren Lebermetabolismus erklärt wird (Endo et al. 1979, Joles et al. 1992). Deshalb wurde die subkutane Applikation zur Vermeidung des First-Pass-Effektes gewählt. In der vorliegenden Arbeit wurde keine wesentliche Reizung an der Injektionsstelle beobachtet, wie sie bei Statingabe vorbeschrieben wurde (Joles et al. 1992).

Eine mögliche Neuroprotektion durch gasförmige Anästhetika nach neuronaler Läsion (Kawaguchi et al. 2005) ließ sich anhand des Vergleichs der mit Vehikel behandelten Tieren hier nicht bestätigen.

## **6.2 Lovastatin senkt die Anzahl Bim-positiver retinaler Ganglienzellen ohne die *bim*-Expression in der Gesamt-Retina zu beeinflussen**

Es ist schon länger bekannt, dass dem proapoptotischen Protein Bim eine Schlüsselrolle beim programmierten Zelltod von sympathischen Neuronen zukommt (Putcha et al. 2001). Auch bei der Entwicklung der Retina scheint Bim einen großen Einfluss zu haben. So konnte gezeigt werden, dass der programmierte Zelltod postnataler RGZ in *bim*<sup>-/-</sup> Mäusen deutlich verzögert ist (Doonan et al. 2007). Es wurden bereits diverse Auslösemechanismen für Apoptose entdeckt, wie Serumentzug in der Zellkultur, Zytokinmangel, Kalziuminflux, UV-Licht, oxidativer Stress und Störungen des Zytoskeletts, bei denen Bim eine wichtige Bedeutung einnimmt. In diesem



Zusammenhang steht der Teil der vorliegenden Arbeit, der sich mit einer möglichen Auswirkung des neuroprotektiven Effekts von Statinen auf Bim auseinandersetzt.

Während in unbehandelten Tieren immunhistochemisch kaum Bim-gefärbte RGZ zu finden waren, zeigte sich nach 4 Tagen Axotomie ein deutlicher Anstieg um 2522%. Dabei wurden nur RGZ gefärbt, während sich in den anderen retinalen Schichten keine Änderung ergab. Die Zunahme Bim-positiver RGZ an Tag 4 ist auch schon in einer anderen Arbeit beschrieben worden (Näpänkangas et al. 2003), wobei die absoluten Werte nicht vergleichbar sind, da in der zitierten Arbeit nur die Region um den optischen Nerv gezählt wurde.

Nach Axotomie scheint von den BOPs nur Bim eine Rolle zu spielen, da weder eine Erhöhung von Bad, Bid, Bik oder Puma nachgewiesen werden konnte und in *bim*<sup>-/-</sup> Mäusen nach Axotomie die Apoptose stark verzögert ist (McKernan und Cotter 2007). Dieser Effekt könnte mit der Freisetzung von Bim bei Schädigung zytoskeletaler Strukturen durch die Axotomie zusammenhängen, denn Bim liegt in gesunden Zellen größtenteils an das Zytoskelett gebunden vor (Puthalakath et al. 1999). Da Wachstumsfaktorentzug in neuronalen Kulturen eine Zunahme von Bim bewirkt (Putcha et al. 2001, Gomez-Vicente et al. 2006), ist die beobachtete Zunahme von Bim in retinalen Ganglienzellen nach Axotomie möglicherweise zum Teil durch den fehlenden retrograden Transport von neuronalen Wachstumsfaktoren bedingt. Es konnte jedoch auch bereits gezeigt werden, dass die Hemmung des axonalen Transportes mit Lidocain nur eine begrenzte Apoptose von RGZ hervorruft (Fagiolini et al. 1997). Nach Axotomie kommt es zu einem Kalzium-Influx mit Aktivitätszunahme von  $\mu$ - und m-Calpain (McKernan et al. 2007). *Bim*<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen eine erhöhte Resistenz gegenüber einer durch Kalzium-Ionophore induzierten Apoptose (Doonan et al. 2007), weshalb Bim auch hinsichtlich der Apoptose durch kalziuminduzierte Exzitotoxizität eine große Bedeutung zukommt. Eine weitere Einflussmöglichkeit auf die Bim-Expression durch Axotomie ist die vermehrte Expression einer rattenspezifischen JNK inhibierenden Kinase (JIK) in RGZ, welche zu einer erhöhten Bim-Expression führt (Wakabayashi et al. 2005).

Die beobachtete starke Bim-Färbung der Photorezeptorenschicht in den Gefrierschnitten (Siehe Abbildung 12 a) könnte mit dem hohen Zellumsatz in dieser Schicht zusammenhängen, welcher besonders bei Albinoratten durch die geringere UV-Toleranz erhöht sein könnte (Gomez-Vicente et al. 2006).

Eine Behandlung mit 8 mg/kg Lovastatin führte zu einer signifikanten Abnahme Bim-positiver RGZ um 27% im Vergleich zur Vehikel-Gruppe. Dieser Rückgang Bim-positiver Zellen durch die Behandlung mit Lovastatin könnte durch dessen direktes Eingreifen in die apoptotische Signalkaskade bedingt sein. So führt eine Statinbehandlung zu einer Aktivierung des PI3K/Akt/Erk Signalweges (Merla et al. 2007, Kretz et al. 2006), wobei Akt und Erk1/2 über eine Phosphorylierung von Bim an Ser<sup>87</sup> und Ser<sup>65</sup> dessen Inaktivierung und Dissoziation von Bcl-x<sub>L</sub> und Mcl-1 sowie einen erhöhten Abbau bewirken (Luciano et al. 2003, Ewings et al. 2007b, Qi et al. 2006). Zusätzlich kann über eine FOXO3A-Inaktivierung durch Akt die *bim*-Expression vermindert werden (Qi et al. 2006). Auch kommt es nach Axotomie zu einer starken JNK/c-Jun Aktivierung (Robinson 1995), die zu einer vermehrten Bim-Freisetzung vom Zytoskelett mittels Phosphorylierung an Thr<sup>56</sup> führt (Lei und Davis 2003). Statinbehandlung bewirkt jedoch eine Abnahme von c-Jun (Lee et al. 2008) und damit möglicherweise eine geringere Aktivität von Bim. Prinzipiell können alle durch Statine verursachten neuroprotektiven Effekte zu einer Bim-Aktivitätsabnahme führen, da jede Hemmung des intrinsischen Apoptoseweges, direkt oder indirekt, sich mit großer Wahrscheinlichkeit auch auf Bim auswirken kann.

Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob der beschriebene Effekt auf Proteinebene auch auf der Expressionsebene zu finden ist. Dafür wurde mit Hilfe einer RT-PCR die Expression von *bim*-mRNA in der Retina nach 4 Tagen quantifiziert. Es zeigte sich nach 4 Tagen eine 2,4-fache Zunahme der *bim*-mRNA. Dieser Befund deckt sich gut mit den Angaben in der Literatur (2,7-fach) (Näpänkangas et al. 2003). Eine Statinbehandlung über 4 Tage führte jedoch zu keiner fassbaren Änderung der *bim*-mRNA. Dies kann einerseits bedeuten, dass die Wahl des Zeitpunktes ungünstig für die Messung des Einflusses durch Statine war, was eine Untersuchung zu verschiedenen anderen Zeitpunkten nahelegen würde. Andererseits kann der Befund auch dahingehend gedeutet werden, dass nur die Aktivität schon

vorhandener Bim-Proteine durch die Behandlung von Lovastatin geändert wird. Als mögliche Erklärung kommt oben genannte Einflussnahme auf Phosphorylierungsmuster in Betracht, ohne dass dadurch eine Expressionsmodifikation durch Statine nachweisbar wäre. Zusätzlich ist auf diesem Weg eine Verstärkung des Bim-Abbaus denkbar. Somit würde sich zwar ein Unterschied auf Protein-Ebene, aber nicht auf Expressionsebene zeigen lassen. Auch eine indirekte Änderung der intrinsischen Signalkaskade könnte zu dieser Diskrepanz führen. So wurde mehrfach gezeigt, dass Statine zu einer Erhöhung von Bcl-2 in Neuronen führen (Franke et al. 2007, Johnson-Anuna et al. 2007). Ein Zunahme von Bcl-2 kann dann über die Bindung an Bim zu dessen vermehrter Inaktivierung beitragen, ohne dass eine Änderung der absoluten Bim-Konzentration stattfindet. Darüber hinaus gilt es zu bedenken, dass Änderungen von Bim in den RGZ, die in den Gefrierschnitten durch selektive Auswertung der Ganglienzellschicht festgestellt wurden, in der Messung der *bim*-mRNA aus Proben der gesamten Retina untergehen könnten, da die RGZ nur einen geringen Anteil an den Zellen der gesamten Retina ausmachen.

In der Literatur finden sich – in scheinbarem Gegensatz zu den bisher dargestellten protektiven Wirkungen – auch Hinweise auf mögliche zytotoxische Effekte von Statinen. So stehen neuroprotektive und allgemein zytoprotektive Substanzen immer wieder im Verdacht, durch ihre antiapoptotische Funktion eine kanzerogene Wirkung zu haben. Die Ergebnisse sind in diesem Zusammenhang jedoch nicht eindeutig. Bei Statinen gibt es jedoch seit längerem auch Untersuchungen zu ihren anti-kanzerogenen Eigenschaften (Sassano und Plataniias 2008), wobei eine aktuelle Meta-Analyse zum Schluss kommt, dass Statine nach derzeitiger Datenlage kurzfristig weder eine sichere pro- noch anti-kanzerogene Wirkung besitzen (Kuoppala et al. 2008). Für eine vermutete anti-kanzerogene Wirkung von Statinen könnte die Tatsache sprechen, dass eine Vielzahl von Untersuchungen Statinen eine apoptotische Wirkung zuschreiben. So auch im neuronalen Bereich, wo es jedoch meist Kulturen mit embryonalen, fetalen oder postnatalen Zellen sind, die durch ihre Entwicklung und ihr Wachstum stärker auf eine funktionierende Cholesterinsynthese und Isoprenylierung von Proteinen angewiesen sind (Michikawa und Yanagisawa

1999, Pavlov et al. 1995, Schulz et al. 2004, Tanaka et al. 2000). Auch wurde in einer Kultur mit fetalen Rattenhirn-Neuroblasten nachgewiesen, dass Lovastatin über eine JNK/c-Jun Erhöhung und einer damit verbundenen Bim<sub>EL</sub> Steigerung Apoptose hervorrufen kann, (Cerezo-Guisado et al. 2007). Auch *in vivo* sind negative Effekte auf die Re-Myelinisierung nach Läsionen (Klopfleisch et al. 2008) und die Photorezeptoren-Homöostase beschrieben worden (Pittler et al. 1995). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Statine einerseits einen hemmenden Effekt auf die Zellproliferation und Differenzierung bei sich entwickelndem Gewebe haben, während bei ausdifferenzierten adulten Zellen eher der protektive Charakter im Vordergrund steht. Abschließend lässt sich sagen, dass Statine aufgrund ihrer neuroprotektiven Wirkung in verschiedenen Tiermodellen und klinischen Studien und wegen ihres günstigen Nebenwirkungsprofils einen wichtigen Platz in der Therapie des Schlaganfalls einnehmen, auch wenn weiterhin unklar bleibt, welche der zahlreichen Einflüsse oder deren Kombination für diese Wirkung verantwortlich ist.

## 7. Schlussfolgerungen

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die tägliche systemische Applikation von Lovastatin direkt nach Axotomie des optischen Nerven bei der Ratte die Apoptose retinaler Ganglienzellen deutlich vermindert. Dieses Ergebnis bestätigt den protektiven Effekt von Statinen *in vivo* auf neuronale Zellen in der Akuttherapie, welcher in experimentellen Untersuchungen mit anderen Läsionsmodellen bereits beschrieben wurde. Ob dieser Aufschub des endgültigen Zelltods einen längerfristigen Effekt darstellt, ist eher fraglich, jedoch wird das Zeitfenster für andere Therapieoptionen verlängert. Ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit ist die Möglichkeit, die Zunahme der Bim-Aktivität in RGZ nach Axotomie durch Lovastatingabe teilweise zu unterdrücken. Allerdings ließ sich unter denselben Bedingungen keine Änderung der *bim*-Expression nachweisen. Für diesen scheinbaren Widerspruch gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten. Auf methodischer Seite bleibt das Problem, dass für die RT-PCR die gesamte Retina verwendet wurde. Dadurch können feine Unterschiede in der *bim*-mRNA Konzentration von RGZ überlagert werden. Dieses Problem ließe sich zum Beispiel durch selektive Abtragung der Ganglienzellschicht umgehen („*Retinal shaving*“) (McKernan und Cotter 2007). Versuche mit weiteren Messzeitpunkten könnten eine mögliche Dynamik der Statinwirkung auf die *bim*-Expression erfassen. Des Weiteren wäre es interessant zu untersuchen, wie sich nach Statingabe das Bim-Phosphorylierungsmuster ändert, um weitere Wirkmechanismen aufzudecken. Um den Einfluss der Statintherapie auf axotomisierte RGZ besser zu verstehen und die Funktion von Bim genauer einordnen zu können, ist die Analyse weiterer pro- und anti-apoptotischer Proteine wie Bcl-2 und Bax notwendig. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen auf Grund des Tiermodells keinen unmittelbaren Schluss auf eine mögliche funktionelle Besserung der Sehfähigkeit durch Statine zu, da durch die Axotomie des optischen Nerven das Sehvermögen komplett zerstört wird. Daher müsste die funktionelle Wirkung einer Statintherapie an anderen Modellen, wie zum Beispiel an Ischämie-Modellen, untersucht werden. Auch ist das optimale Zeitfenster der Statingabe noch ungeklärt. Eine direkte

Therapie nach Läsion, wie sie in dieser Arbeit angewendet wurde, ist in der klinischen Praxis meist nicht zu bewerkstelligen.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine systemische Statintherapie nach Läsion auf experimenteller Ebene einen neuroprotektiven Effekt auf adulte Neurone *in vivo* besitzt und direkt oder indirekt einen Einfluss auf die Bim-Aktivität nimmt, ohne dass eine Expressionänderung nachgewiesen wurde. Diese Ergebnisse bestätigen die Bedeutung von Statinen in der Therapie des Schlaganfalls.

## 8. Literaturverzeichnis

- Acheampong E, Parveen Z, Mengistu A, Ngoubilly N, Wigdahl B, Lossinsky AS, Pomerantz RJ, Mukhtar M. 2007. Cholesterol-depleting statin drugs protect postmitotically differentiated human neurons against ethanol- and human immunodeficiency virus type 1-induced oxidative stress in vitro. *J Virol*, 81 (3):1492-1501.
- Alberts AW, Chen J, Kuron G, Hunt V, Huff J, Hoffman C, Rothrock J, Lopez M, Joshua H, Harris E, Patchett A, Monaghan R, Currie S, Stapley E, Albers-Schonberg G, Hensens O, Hirshfield J, Hoogsteen K, Liesch J, Springer J. 1980. Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77 (7):3957-3961.
- Amarenco P, Labreuche J, Lavalley P, Touboul PJ. 2004. Statins in stroke prevention and carotid atherosclerosis: systematic review and up-to-date meta-analysis. *Stroke*, 35 (12):2902-2909.
- Amarenco P, Bogousslavsky J, Callahan A, 3rd, Goldstein LB, Hennerici M, Rudolph AE, Silesen H, Simunovic L, Szarek M, Welch KM, Zivin JA. 2006. High-dose atorvastatin after stroke or transient ischemic attack. *N Engl J Med*, 355 (6):549-559.
- Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V. 1994. A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *N Engl J Med*, 330 (9):585-591.
- Berkelaar M, Clarke DB, Wang YC, Bray GM, Aguayo AJ. 1994. Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats. *J Neurosci*, 14 (7):4368-4374.
- Berry M, Ahmed Z, Lorber B, Douglas M, Logan A. 2008. Regeneration of axons in the visual system. *Restor Neurol Neurosci*, 26 (2-3):147-174.
- Bösel J, Gandor F, Harms C, Synowitz M, Harms U, Djoufack PC, Megow D, Dirnagl U, Hörtnagl H, Fink KB, Endres M. 2005. Neuroprotective effects of atorvastatin against glutamate-induced excitotoxicity in primary cortical neurones. *J Neurochem*, 92 (6):1386-1398.
- Bouillet P, Cory S, Zhang LC, Strasser A, Adams JM. 2001. Degenerative disorders caused by Bcl-2 deficiency prevented by loss of its BH3-only antagonist Bim. *Dev Cell*, 1 (5):645-653.
- Bouillet P, Metcalf D, Huang DC, Tarlinton DM, Kay TW, Kontgen F, Adams JM, Strasser A. 1999. Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science*, 286 (5445):1735-1738.
- Brown AG, Smale TC, King TJ, Hasenkamp R, Thompson RH. 1976. Crystal and molecular structure of compactin, a new antifungal metabolite from *Penicillium brevicompactum*. *J Chem Soc [Perkin 1]*, (11):1165-1170.
- Buss RR, Oppenheim RW. 2004. Role of programmed cell death in normal neuronal development and function. *Anat Sci Int*, 79 (4):191-197.
- Cerezo-Guisado MI, Alvarez-Barrientos A, Argent R, Garcia-Marin LJ, Bragado MJ, Lorenzo MJ. 2007. c-Jun N-terminal protein kinase signalling pathway mediates lovastatin-induced rat brain neuroblast apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, 1771 (2):164-176.

- Chen J, Zacharek A, Li A, Cui X, Roberts C, Lu M, Chopp M. 2008. Atorvastatin promotes presenilin-1 expression and Notch1 activity and increases neural progenitor cell proliferation after stroke. *Stroke*, 39 (1):220-226.
- Chen L, Willis SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JI, Hinds MG, Colman PM, Day CL, Adams JM, Huang DC. 2005. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell*, 17 (3):393-403.
- Chipuk JE, Green DR. 2008. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol*, 18 (4):157-164.
- Crisby M, Nordin-Fredriksson G, Shah PK, Yano J, Zhu J, Nilsson J. 2001. Pravastatin treatment increases collagen content and decreases lipid content, inflammation, metalloproteinases, and cell death in human carotid plaques: implications for plaque stabilization. *Circulation*, 103 (7):926-933.
- Dijkers PF, Birkenkamp KU, Lam EW, Thomas NS, Lammers JW, Koenderman L, Coffey PJ. 2002. FKHR-L1 can act as a critical effector of cell death induced by cytokine withdrawal: protein kinase B-enhanced cell survival through maintenance of mitochondrial integrity. *J Cell Biol*, 156 (3):531-542.
- Doonan F, Donovan M, Gomez-Vicente V, Bouillet P, Cotter TG. 2007. Bim expression indicates the pathway to retinal cell death in development and degeneration. *J Neurosci*, 27 (40):10887-10894.
- Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, Cepek L, Lewczuk P, Stiefel M, Rustenbeck HH, Breiter N, Jacob S, Knerlich F, Bohn M, Poser W, R  ther E, Kochen M, Gefeller O, Gleiter C, Wessel TC, De Ryck M, Itri L, Prange H, Cerami A, Brines M, Siren AL. 2002. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med*, 8 (8):495-505.
- Elkind MS, Sacco RL, Macarthur RB, Peerschke E, Neils G, Andrews H, Stillman J, Corporan T, Leifer D, Liu R, Cheung K. 2009. High-dose lovastatin for acute ischemic stroke: results of the phase I dose escalation neuroprotection with statin therapy for acute recovery trial (NeuSTART). *Cerebrovasc Dis*, 28 (3):266-275.
- Elmore S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35 (4):495-516.
- Endo A, Kuroda M, Tsujita Y. 1976. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterol synthesis produced by *Penicillium citrinum*. *J Antibiot (Tokyo)*, 29 (12):1346-1348.
- Endo A, Tsujita Y, Kuroda M, Tanzawa K. 1979. Effects of ML-236B on cholesterol metabolism in mice and rats: lack of hypocholesterolemic activity in normal animals. *Biochim Biophys Acta*, 575 (2):266-276.
- Essig M, Nguyen G, Prie D, Escoubet B, Sraer JD, Friedlander G. 1998. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors increase fibrinolytic activity in rat aortic endothelial cells. Role of geranylgeranylation and Rho proteins. *Circ Res*, 83 (7):683-690.
- Ewings KE, Wiggins CM, Cook SJ. 2007a. Bim and the pro-survival Bcl-2 proteins: opposites attract, ERK repels. *Cell Cycle*, 6 (18):2236-2240.
- Ewings KE, Hadfield-Moorhouse K, Wiggins CM, Wickenden JA, Balmanno K, Gilley R, Degenhardt K, White E, Cook SJ. 2007b. ERK1/2-



- dependent phosphorylation of BimEL promotes its rapid dissociation from Mcl-1 and Bcl-xL. *EMBO J*, 26 (12):2856-2867.
- Fagiolini M, Caleo M, Strettoi E, Maffei L. 1997. Axonal transport blockade in the neonatal rat optic nerve induces limited retinal ganglion cell death. *J Neurosci*, 17 (18):7045-7052.
- Fischer D, Pavlidis M, Thanos S. 2000. Cataractogenic lens injury prevents traumatic ganglion cell death and promotes axonal regeneration both in vivo and in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41 (12):3943-3954.
- Franke C, Nöldner M, Abdel-Kader R, Johnson-Anuna LN, Gibson Wood W, Müller WE, Eckert GP. 2007. Bcl-2 upregulation and neuroprotection in guinea pig brain following chronic simvastatin treatment. *Neurobiol Dis*, 25 (2):438-445.
- Friesen JA, Rodwell VW. 2004. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A (HMG-CoA) reductases. *Genome Biol*, 5 (11):248.
- Garcia-Valenzuela E, Sharma SC, Pina AL. 2005. Multilayered retinal microglial response to optic nerve transection in rats. *Mol Vis*, 11:225-231.
- Garcia-Valenzuela E, Gorczyca W, Darzynkiewicz Z, Sharma SC. 1994. Apoptosis in adult retinal ganglion cells after axotomy. *J Neurobiol*, 25 (4):431-438.
- Gavathiotis E, Suzuki M, Davis ML, Pitter K, Bird GH, Katz SG, Tu HC, Kim H, Cheng EH, Tjandra N, Walensky LD. 2008. BAX activation is initiated at a novel interaction site. *Nature*, 455 (7216):1076-1081.
- Gewies A. 2004. Introduction to Apoptosis [Review]. <http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/apointro.pdf>.
- Gilley J, Coffey PJ, Ham J. 2003. FOXO transcription factors directly activate bim gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons. *J Cell Biol*, 162 (4):613-622.
- Ginsberg MD. 2008. Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharmacology*, 55 (3):363-389.
- Ginsberg MD, Palesch YY, Hill MD. 2006. The ALIAS (ALbumin In Acute Stroke) Phase III randomized multicentre clinical trial: design and progress report. *Biochem Soc Trans*, 34 (Pt 6):1323-1326.
- Goldstein JL, Brown MS. 1990. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*, 343 (6257):425-430.
- Gomez-Vicente V, Doonan F, Donovan M, Cotter TG. 2006. Induction of BIM(EL) following growth factor withdrawal is a key event in caspase-dependent apoptosis of 661W photoreceptor cells. *Eur J Neurosci*, 24 (4):981-990.
- Green DR, Kroemer G. 2004. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, 305 (5684):626-629.
- Greenwood J, Steinman L, Zamvil SS. 2006. Statin therapy and autoimmune disease: from protein prenylation to immunomodulation. *Nat Rev Immunol*, 6 (5):358-370.
- Haag MD, Hofman A, Koudstaal PJ, Stricker BH, Breteler MM. 2009. Statins are associated with a reduced risk of Alzheimer disease regardless of lipophilicity. The Rotterdam Study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 80 (1):13-17.
- Harada H, Quearry B, Ruiz-Vela A, Korsmeyer SJ. 2004. Survival factor-induced extracellular signal-regulated kinase phosphorylates BIM,

- inhibiting its association with BAX and proapoptotic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (43):15313-15317.
- Harman AM, MacDonald A, Meyer P, Ahmat A. 2003. Numbers of neurons in the retinal ganglion cell layer of the rat do not change throughout life. *Gerontology*, 49 (6):350-355.
- He X, Jenner AM, Ong WY, Farooqui AA, Patel SC. 2006. Lovastatin modulates increased cholesterol and oxysterol levels and has a neuroprotective effect on rat hippocampal neurons after kainate injury. *J Neuropathol Exp Neurol*, 65 (7):652-663.
- Hemmen TM, Lyden PD. 2007. Induced hypothermia for acute stroke. *Stroke*, 38 (2 Suppl):794-799.
- Hengartner MO. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407 (6805):770-776.
- Horvitz HR. 1999. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res*, 59 (7 Suppl):1701s-1706s.
- Hou B, You SW, Wu MM, Kuang F, Liu HL, Jiao XY, Ju G. 2004. Neuroprotective effect of inosine on axotomized retinal ganglion cells in adult rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45 (2):662-667.
- Isenmann S, Kretz A, Cellerino A. 2003. Molecular determinants of retinal ganglion cell development, survival, and regeneration. *Prog Retin Eye Res*, 22 (4):483-543.
- Isenmann S, Klöcker N, Gravel C, Bähr M. 1998. Protection of axotomized retinal ganglion cells by adenovirally delivered BDNF in vivo. *Eur J Neurosci*, 10 (8):2751-2756.
- Isenmann S, Wahl C, Krajewski S, Reed JC, Bähr M. 1997. Up-regulation of Bax protein in degenerating retinal ganglion cells precedes apoptotic cell death after optic nerve lesion in the rat. *Eur J Neurosci*, 9 (8):1763-1772.
- Istvan ES, Deisenhofer J. 2001. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science*, 292 (5519):1160-1164.
- Johnson-Anuna LN, Eckert GP, Franke C, Igbavboa U, Muller WE, Wood WG. 2007. Simvastatin protects neurons from cytotoxicity by up-regulating Bcl-2 mRNA and protein. *J Neurochem*, 101 (1):77-86.
- Johnson-Anuna LN, Eckert GP, Keller JH, Igbavboa U, Franke C, Fechner T, Schubert-Zsilavecz M, Karas M, Muller WE, Wood WG. 2005. Chronic administration of statins alters multiple gene expression patterns in mouse cerebral cortex. *J Pharmacol Exp Ther*, 312 (2):786-793.
- Joles J, Willekes-Koolschijn N, Koomans H, Van Tol A, Geelhoed-Mieras T, Crommelin D, Van Bloois L, Krajnc-Franken M, Cohen L, Griffioen M, et al. 1992. Subcutaneous administration of HMG-CoA reductase inhibitors in hyperlipidaemic and normal rats. *Lab Anim*, 26 (4):269-280.
- Kawaguchi M, Furuya H, Patel PM. 2005. Neuroprotective effects of anesthetic agents. *J Anesth*, 19 (2):150-156.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26 (4):239-257.
- Kikuchi R, Kusuhara H, Abe T, Endou H, Sugiyama Y. 2004. Involvement of multiple transporters in the efflux of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors across the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther*, 311 (3):1147-1153.

- Klopfleisch S, Merkler D, Schmitz M, Kloppner S, Schedensack M, Jeserich G, Althaus HH, Bruck W. 2008. Negative impact of statins on oligodendrocytes and myelin formation in vitro and in vivo. *J Neurosci*, 28 (50):13609-13614.
- Koeberle PD, Ball AK. 1999. Nitric oxide synthase inhibition delays axonal degeneration and promotes the survival of axotomized retinal ganglion cells. *Exp Neurol*, 158 (2):366-381.
- Kretz A, Happold CJ, Marticke JK, Isenmann S. 2005. Erythropoietin promotes regeneration of adult CNS neurons via Jak2/Stat3 and PI3K/AKT pathway activation. *Mol Cell Neurosci*, 29 (4):569-579.
- Kretz A, Schmeer C, Tausch S, Isenmann S. 2006. Simvastatin promotes heat shock protein 27 expression and Akt activation in the rat retina and protects axotomized retinal ganglion cells in vivo. *Neurobiol Dis*, 21 (2):421-430.
- Kuoppala J, Lamminpaa A, Pukkala E. 2008. Statins and cancer: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer*, 44 (15):2122-2132.
- Kwak B, Mulhaupt F, Myit S, Mach F. 2000. Statins as a newly recognized type of immunomodulator. *Nat Med*, 6 (12):1399-1402.
- Laufs U, Liao JK. 1998. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem*, 273 (37):24266-24271.
- Laufs U, Marra D, Node K, Liao JK. 1999. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors attenuate vascular smooth muscle proliferation by preventing rho GTPase-induced down-regulation of p27(Kip1). *J Biol Chem*, 274 (31):21926-21931.
- Lee ST, Chu K, Park JE, Hong NH, Im WS, Kang L, Han Z, Jung KH, Kim MW, Kim M. 2008. Atorvastatin attenuates mitochondrial toxin-induced striatal degeneration, with decreasing iNOS/c-Jun levels and activating ERK/Akt pathways. *J Neurochem*, 104 (5):1190-1200.
- Lei K, Davis RJ. 2003. JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (5):2432-2437.
- Levin LA, Peeples P. 2008. History of neuroprotection and rationale as a therapy for glaucoma. *Am J Manag Care*, 14 (1 Suppl):S11-14.
- Ley R, Ewings KE, Hadfield K, Cook SJ. 2005. Regulatory phosphorylation of Bim: sorting out the ERK from the JNK. *Cell Death Differ*, 12 (8):1008-1014.
- Liao JK, Laufs U. 2005. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 45:89-118.
- Lieven CJ, Hoegger MJ, Schlieve CR, Levin LA. 2006. Retinal ganglion cell axotomy induces an increase in intracellular superoxide anion. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47 (4):1477-1485.
- Liu X, Dai S, Zhu Y, Marrack P, Kappler JW. 2003. The structure of a Bcl-xL/Bim fragment complex: implications for Bim function. *Immunity*, 19 (3):341-352.
- Logue SE, Martin SJ. 2008. Caspase activation cascades in apoptosis. *Biochem Soc Trans*, 36 (Pt 1):1-9.
- Luciano F, Jacquelin A, Colosetti P, Herrant M, Cagnol S, Pages G, Auburger P. 2003. Phosphorylation of Bim-EL by Erk1/2 on serine 69 promotes

- its degradation via the proteasome pathway and regulates its proapoptotic function. *Oncogene*, 22 (43):6785-6793.
- Marani M, Tenev T, Hancock D, Downward J, Lemoine NR. 2002. Identification of novel isoforms of the BH3 domain protein Bim which directly activate Bax to trigger apoptosis. *Mol Cell Biol*, 22 (11):3577-3589.
- Marani M, Hancock D, Lopes R, Tenev T, Downward J, Lemoine NR. 2004. Role of Bim in the survival pathway induced by Raf in epithelial cells. *Oncogene*, 23 (14):2431-2441.
- Marcoff L, Thompson PD. 2007. The role of coenzyme Q10 in statin-associated myopathy: a systematic review. *J Am Coll Cardiol*, 49 (23):2231-2237.
- McKernan DP, Cotter TG. 2007. A Critical role for Bim in retinal ganglion cell death. *J Neurochem*, 102 (3):922-930.
- McKernan DP, Guerin MB, O'Brien CJ, Cotter TG. 2007. A key role for calpains in retinal ganglion cell death. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48 (12):5420-5430.
- Merla R, Ye Y, Lin Y, Manickavasagam S, Huang MH, Perez-Polo RJ, Uretsky BF, Birnbaum Y. 2007. The central role of adenosine in statin-induced ERK1/2, Akt, and eNOS phosphorylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 293 (3):H1918-1928.
- Michikawa M, Yanagisawa K. 1999. Inhibition of cholesterol production but not of nonsterol isoprenoid products induces neuronal cell death. *J Neurochem*, 72 (6):2278-2285.
- Nagaoka T, Takahashi A, Sato E, Izumi N, Hein TW, Kuo L, Yoshida A. 2006. Effect of systemic administration of simvastatin on retinal circulation. *Arch Ophthalmol*, 124 (5):665-670.
- Nakazawa T, Takahashi H, Nishijima K, Shimura M, Fuse N, Tamai M, Hafezi-Moghadam A, Nishida K. 2007. Pitavastatin prevents NMDA-induced retinal ganglion cell death by suppressing leukocyte recruitment. *J Neurochem*, 100 (4):1018-1031.
- Näpänkangas U, Lindqvist N, Lindholm D, Hallböök F. 2003. Rat retinal ganglion cells upregulate the pro-apoptotic BH3-only protein Bim after optic nerve transection. *Brain Res Mol Brain Res*, 120 (1):30-37.
- Nicotera P, Leist M, Ferrando-May E. 1998. Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Toxicol Lett*, 102-103:139-142.
- O'Collins VE, Macleod MR, Donnan GA, Horky LL, van der Worp BH, Howells DW. 2006. 1,026 experimental treatments in acute stroke. *Ann Neurol*, 59 (3):467-477.
- O'Connor L, Strasser A, O'Reilly LA, Hausmann G, Adams JM, Cory S, Huang DC. 1998. Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J*, 17 (2):384-395.
- O'Reilly LA, Cullen L, Visvader J, Lindeman GJ, Print C, Bath ML, Huang DC, Strasser A. 2000. The proapoptotic BH3-only protein bim is expressed in hematopoietic, epithelial, neuronal, and germ cells. *Am J Pathol*, 157 (2):449-461.
- Pahan K, Sheikh FG, Namboodiri AM, Singh I. 1997. Lovastatin and phenylacetate inhibit the induction of nitric oxide synthase and cytokines in rat primary astrocytes, microglia, and macrophages. *J Clin Invest*, 100 (11):2671-2679.

- Pavlov OV, Bobryshev Yu V, Balabanov Yu V, Ashwell K. 1995. An in vitro study of the effects of lovastatin on human fetal brain cells. *Neurotoxicol Teratol*, 17 (1):31-39.
- Pedersen TR, Kjekshus J, Berg K, Haghfelt T, Faergeman O, Faergeman G, Pyorala K, Miettinen T, Wilhelmsen L, Olsson AG, Wedel H. 2004. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). 1994. *Atheroscler Suppl*, 5 (3):81-87.
- Pittler SJ, Fliesler SJ, Fisher PL, Keller PK, Rapp LM. 1995. In vivo requirement of protein prenylation for maintenance of retinal cytoarchitecture and photoreceptor structure. *J Cell Biol*, 130 (2):431-439.
- Putcha GV, Moulder KL, Golden JP, Bouillet P, Adams JA, Strasser A, Johnson EM. 2001. Induction of BIM, a proapoptotic BH3-only BCL-2 family member, is critical for neuronal apoptosis. *Neuron*, 29 (3):615-628.
- Puthalakath H, Strasser A. 2002. Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ*, 9 (5):505-512.
- Puthalakath H, Huang DC, O'Reilly LA, King SM, Strasser A. 1999. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell*, 3 (3):287-296.
- Qi XJ, Wildey GM, Howe PH. 2006. Evidence that Ser87 of BimEL is phosphorylated by Akt and regulates BimEL apoptotic function. *J Biol Chem*, 281 (2):813-823.
- Quigley HA, Nickells RW, Kerrigan LA, Pease ME, Thibault DJ, Zack DJ. 1995. Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 36 (5):774-786.
- Reisberg B, Doody R, Stoffer A, Schmitt F, Ferris S, Mobius HJ. 2003. Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, 348 (14):1333-1341.
- Robinson GA. 1995. Axotomy-induced regulation of c-Jun expression in regenerating rat retinal ganglion cells. *Brain Res Mol Brain Res*, 30 (1):61-69.
- Sacks FM, Pfeffer MA, Moyer LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, Brown L, Warnica JW, Arnold JM, Wun CC, Davis BR, Braunwald E. 1996. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N Engl J Med*, 335 (14):1001-1009.
- Saheki A, Terasaki T, Tamai I, Tsuji A. 1994. In vivo and in vitro blood-brain barrier transport of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors. *Pharm Res*, 11 (2):305-311.
- Sassano A, Plataniias LC. 2008. Statins in tumor suppression. *Cancer Lett*, 260 (1-2):11-19.
- Saver JL, Kidwell C, Eckstein M, Starkman S. 2004. Prehospital neuroprotective therapy for acute stroke: results of the Field Administration of Stroke Therapy-Magnesium (FAST-MAG) pilot trial. *Stroke*, 35 (5):e106-108.

- Schachter M. 2005. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundam Clin Pharmacol*, 19 (1):117-125.
- Schmeer C, Kretz A, Isenmann S. 2006. Statin-mediated protective effects in the central nervous system: general mechanisms and putative role of stress proteins. *Restor Neurol Neurosci*, 24 (2):79-95.
- Schmeer C, Kretz A, Isenmann S. 2007. Therapeutic potential of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors for the treatment of retinal and eye diseases. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 6 (4):282-287.
- Schmeer C, Gamez A, Tausch S, Witte OW, Isenmann S. 2008. Statins modulate heat shock protein expression and enhance retinal ganglion cell survival after transient retinal ischemia/reperfusion in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49 (11):4971-4981.
- Schulz JG, Bosel J, Stoeckel M, Megow D, Dirnagl U, Endres M. 2004. HMG-CoA reductase inhibition causes neurite loss by interfering with geranylgeranylpyrophosphate synthesis. *J Neurochem*, 89 (1):24-32.
- Sena A, Pedrosa R, Graca Morais M. 2003. Therapeutic potential of lovastatin in multiple sclerosis. *J Neurol*, 250 (6):754-755.
- Shinjyo T, Kuribara R, Inukai T, Hosoi H, Kinoshita T, Miyajima A, Houghton PJ, Look AT, Ozawa K, Inaba T. 2001. Downregulation of Bim, a proapoptotic relative of Bcl-2, is a pivotal step in cytokine-initiated survival signaling in murine hematopoietic progenitors. *Mol Cell Biol*, 21 (3):854-864.
- Tanaka T, Tatsuno I, Uchida D, Moroo I, Morio H, Nakamura S, Noguchi Y, Yasuda T, Kitagawa M, Saito Y, Hirai A. 2000. Geranylgeranylpyrophosphate, an isoprenoid of mevalonate cascade, is a critical compound for rat primary cultured cortical neurons to protect the cell death induced by 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibition. *J Neurosci*, 20 (8):2852-2859.
- Vaux DL, Cory S, Adams JM. 1988. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, 335 (6189):440-442.
- Vergouwen MD, de Haan RJ, Vermeulen M, Roos YB. 2008. Statin treatment and the occurrence of hemorrhagic stroke in patients with a history of cerebrovascular disease. *Stroke*, 39 (2):497-502.
- Vollmer T, Key L, Durkalski V, Tyor W, Corboy J, Markovic-Plese S, Preiningerova J, Rizzo M, Singh I. 2004. Oral simvastatin treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Lancet*, 363 (9421):1607-1608.
- Vorwerk CK, Zurakowski D, McDermott LM, Mawrin C, Dreyer EB. 2004. Effects of axonal injury on ganglion cell survival and glutamate homeostasis. *Brain Res Bull*, 62 (6):485-490.
- Wakabayashi T, Kosaka J, Oshika T. 2005. JNK inhibitory kinase is up-regulated in retinal ganglion cells after axotomy and enhances BimEL expression level in neuronal cells. *J Neurochem*, 95 (2):526-536.
- Wakeyama H, Akiyama T, Kadono Y, Nakamura M, Oshima Y, Nakamura K, Tanaka S. 2007. Posttranslational regulation of Bim by caspase-3. *Ann N Y Acad Sci*, 1116:271-280.
- Wassmann S, Laufs U, Baumer AT, Muller K, Ahlbory K, Linz W, Itter G, Rosen R, Bohm M, Nickenig G. 2001. HMG-CoA reductase inhibitors improve endothelial dysfunction in normocholesterolemic hypertension

- via reduced production of reactive oxygen species. *Hypertension*, 37 (6):1450-1457.
- Weishaupt JH, Bähr M. 2001. Degeneration of axotomized retinal ganglion cells as a model for neuronal apoptosis in the central nervous system - molecular death and survival pathways. *Restor Neurol Neurosci*, 19 (1-2):19-27.
- Weishaupt JH, Rohde G, Polking E, Siren AL, Ehrenreich H, Bähr M. 2004. Effect of erythropoietin axotomy-induced apoptosis in rat retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45 (5):1514-1522.
- Whitfield J, Neame SJ, Paquet L, Bernard O, Ham J. 2001. Dominant-negative c-Jun promotes neuronal survival by reducing BIM expression and inhibiting mitochondrial cytochrome c release. *Neuron*, 29 (3):629-643.
- Willis SN, Adams JM. 2005. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*, 17 (6):617-625.
- Willis SN, Fletcher JI, Kaufmann T, van Delft MF, Chen L, Czabotar PE, Ierino H, Lee EF, Fairlie WD, Bouillet P, Strasser A, Kluck RM, Adams JM, Huang DC. 2007. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science*, 315 (5813):856-859.
- Woo D, Kissela BM, Khoury JC, Sauerbeck LR, Haverbusch MA, Szaflarski JP, Gebel JM, Pancioli AM, Jauch EC, Schneider A, Kleindorfer D, Broderick JP. 2004. Hypercholesterolemia, HMG-CoA reductase inhibitors, and risk of intracerebral hemorrhage: a case-control study. *Stroke*, 35 (6):1360-1364.
- Yao M, Nguyen TV, Pike CJ. 2007. Estrogen regulates Bcl-w and Bim expression: role in protection against beta-amyloid peptide-induced neuronal death. *J Neurosci*, 27 (6):1422-1433.
- Zacco A, Togo J, Spence K, Ellis A, Lloyd D, Furlong S, Piser T. 2003. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors protect cortical neurons from excitotoxicity. *J Neurosci*, 23 (35):11104-11111.
- Zong WX, Lindsten T, Ross AJ, MacGregor GR, Thompson CB. 2001. BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev*, 15 (12):1481-1486.

## **9. Anhang**

### **9.1 Danksagung**

Besonderer Dank gebührt Prof. Dr. Stefan Isenmann für die Überlassung des Themas und seine hervorragende Betreuung, selbst aus der Ferne. Er ermöglichte es mir, weitgehend selbständig zu forschen und das gute persönliche Verhältnis hat mich ermutigt, auch in schwierigen Zeiten weiterzumachen.

Danken möchte ich auch Dr. Christian Schmeer, der immer ein offenes Ohr für fachliche Fragen hatte und mir mit guten Vorschlägen weiterhalf. Er schaffte es immer wieder, mich durch konstruktive Diskussionen und seine optimistische Art zu motivieren.

Des Weiteren möchte ich allen Mitarbeitern der experimentellen Neurologie Jena danken. Nicht zuletzt durch die gute Atmosphäre im Labor hat mir die Arbeit immer viel Spaß gemacht. Vielen Dank besonders an Svetlana Tausch, die mich in die methodischen Grundlagen der Laborarbeit eingeführt hat und mir die ganze Zeit hindurch bei kleinen und großen Problemen geduldig zur Seite stand.

Der Boehringer Ingelheim Stiftung danke ich sehr für die großzügige Unterstützung durch das Doktoranden-Stipendium, welches mir erlaubt hat, mich ein Jahr intensiv auf meine Forschungstätigkeit zu konzentrieren.

Allen, die bei der Korrektur dieser Arbeit geholfen haben, insbesondere Prof. Dr. Isenmann, Dr. Christian Schmeer und meiner Frau Anne-Geelke, möchte ich meinen herzlichen Dank aussprechen.

Für Ihre Geduld und tatkräftige Unterstützung während meines Studiums danke ich meiner Familie und meinen Freunden. Besonders möchte ich mich bei meiner Frau Anne-Geelke bedanken, die mich in dieser Zeit immer wieder ermutigt hat und mit ihrer Geduld und guten Ideen einen großen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.



## 9.2 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. Stefan Isenmann

Dr. Christian Schmeer

- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
- dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und
- dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 10.09.2009

Philippe Lehmann